
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)

RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS DE MACROALGAS LÓTICAS DO FILO
CHLOROPHYTA SUBMETIDAS À HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO

RÉGIS DE CAMPOS OLIVEIRA

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Biológicas (Biologia Vegetal).

Janeiro - 2018

**RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS DE MACROALGAS LÓTICAS DO FILO
CHLOROPHYTA SUBMETIDAS À HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO**

RÉGIS DE CAMPOS OLIVEIRA

Orientador: Profº. Dr. CIRO CESAR ZANINI BRANCO

Coorientador: Profº. Dr JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Biológicas (Biologia Vegetal).

Rio Claro

Janeiro - 2018

581.652 Oliveira, Régis de Campos
O48r Respostas fotossintéticas de macroalgas lólicas do filo
Chlorophyta submetidas à herbicidas à base de glifosato /
Régis de Campos Oliveira. - Rio Claro, 2018
116 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ciro Cesar Zanini Branco
Coorientador: Joaquim Gonçalves Machado Neto

1. Herbicidas. 2. Glifosato. 3. AMPA. 4. 2,4-D. 5.
Fotossíntese. 6. Macroalgas verdes. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS DE MACROALGAS LÓTICAS DO FILO
CHLOROPHYTA SUBMETIDAS À HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO

AUTOR: REGIS DE CAMPOS OLIVEIRA

ORIENTADOR: CIRO CESAR ZANINI BRANCO

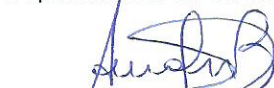
COORIENTADOR: JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



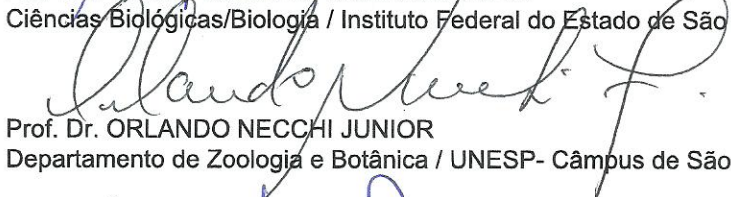
Prof. Dr. CIRO CESAR ZANINI-BRANCO

Departamento de Ciências Biológicas / Unesp- Câmpus de Assis



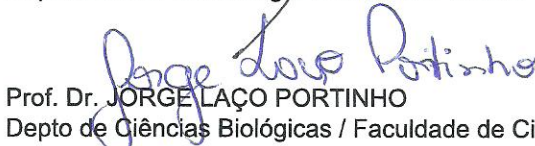
Prof. Dr. ANNA ISABEL NASSAR BAUTISTA

Ciências Biológicas/Biologia / Instituto Federal do Estado de São Paulo (IFSP)



Prof. Dr. ORLANDO NECCHI JUNIOR

Departamento de Zoologia e Botânica / UNESP- Câmpus de São José do Rio Preto/ SP



Prof. Dr. JORGE LAÇO PORTINHO

Depto de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP/Assis



Profa. Dra. CELIA LEITE SANT'ANNA

Núcleo de Pesquisa em Ficologia / INSTITUTO DE BOTANICA

Rio Claro, 23 de janeiro de 2018

CRESCE A PLANTA, floresce,
A flor abrindo, cresce.
Murcha a flor. E eu, que vejo
Crescer planta e flor, e esse
Murchar também, desejo
Saber qual é a prece,
O suspiro, o ensejo
A dar ao que entrevejo.

Fernando Pessoa, 1921

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter colocado tantas pessoas boas em meu caminho que tornaram estes quatro anos muito prazerosos, e que, de alguma forma, contribuíram com este trabalho.

Entre estas pessoas estão meus pais Valdemir e Maria Goreti, e meus irmãos Rhelvis e Raissa, pelo carinho, afeto, e por ainda acreditarem em mim.

Agradeço ao Dr. Ciro Cesar Zanini Branco pelo convívio em todos estes anos (desde a graduação), pelos valiosos ensinamentos e exemplos práticos de como ser um ótimo professor e pesquisador, e pela amizade.

Agradeço ao Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto por ter aceitado ser meu coorientador e pelas idéias que ajudaram no amadurecimento desta tese.

Agradeço aos professores Dr. Orlando Necchi Junior e Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida pela disposição em compartilhar conosco seus conhecimentos sobre a metodologia das análises de evolução do oxigênio dissolvido e da fluorescência de clorofila *a*, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço a Cláudia, minha namorada e melhor amiga, por compartilhar comigo os momentos bons e me dar suporte nos momentos ruins, além de todo o amor e carinho concedido.

Agradeço aos proprietários das fazendas onde os riachos amostrados estão inseridos por permitirem as coletas, em especial, aos senhores Paulo e Rosângela Almeida pelo acolhimento e auxílio na prospecção de novas macroalgas.

Agradeço ao professor Dr. Pitágoras da Conceição Bispo e a todos os amigos que também fazem, ou que já fizeram, parte do Laboratório de Biologia Aquática (LABIA) pela ajuda inestimável e pelos agradáveis momentos de descontração, e em especial ao Lucas Kortz pela amizade e parceria na realização dos experimentos.

Agradeço a todos os demais familiares e amigos que, estando longe ou próximos, sempre me apoiaram.

Por último, agradeço também ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

Sumário

Resumo	6
Abstract.....	7
Introdução Geral.....	8
<i>Justificativa e Objetivos.....</i>	<i>17</i>
Referências Bibliográficas	18
Capítulo 1. Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides and their degradation products on the photosynthesis of <i>Nitella microcarpa</i> var. <i>wrightii</i> (Charophyceae)	30
Abstract.....	31
Introduction.....	31
Materials and Methods	32
Results	33
<i>Photosynthetic rate</i>	<i>33</i>
<i>Dark respiration rate</i>	<i>33</i>
<i>Chlorophyll a content.....</i>	<i>35</i>
Discussion.....	35
References	37
Capítulo 2. Efeito de herbicidas a base de glifosato, e seu produto de degradação, sobre as respostas fotossintéticas de macroalgas verdes em ambientes lóticos tropicais.....	39
Resumo	40
Introdução.....	41
Material e Métodos	43
Resultados	46
<i>Respostas fotossintéticas aos tratamentos experimentais utilizando glifosato grau técnico.....</i>	<i>46</i>
<i>Evolução do oxigênio dissolvido</i>	<i>46</i>
<i>Clorofila a</i>	<i>47</i>
<i>Fluorescência da clorofila a</i>	<i>47</i>
<i>Respostas fotossintéticas aos tratamentos experimentais utilizando a formulação Roundup®</i>	<i>49</i>
<i>Evolução do oxigênio dissolvido</i>	<i>49</i>
<i>Clorofila a</i>	<i>51</i>
<i>Fluorescência da clorofila a</i>	<i>51</i>
<i>Respostas fotossintéticas aos tratamentos experimentais utilizando o tratamento com AMPA.....</i>	<i>52</i>
<i>Evolução do oxigênio dissolvido</i>	<i>52</i>
<i>Clorofila a</i>	<i>53</i>
<i>Fluorescência da clorofila a</i>	<i>53</i>
Discussão	54
Referências Bibliográficas	58
Capítulo 3. Efeito da combinação de herbicidas a base de glifosato e 2,4-D sobre as respostas fotossintéticas de macroalgas verdes de ambientes lóticos tropicais.	82

Resumo	83
Introdução.....	84
Materiais e Métodos.....	86
Resultados	88
<i>Evolução do oxigênio dissolvido</i>	<i>88</i>
<i>Clororofila a</i>	<i>89</i>
<i>Fluorescência da clorofila a.....</i>	<i>89</i>
Discussão	90
Referências Bibliográficas	91
Conclusão Geral	104
Referências Bibliográficas	106
Material Suplementar	108
<i>Método da evolução do oxigênio dissolvido - Técnica dos frascos claros e escuros</i>	<i>108</i>
<i>Método da mensuração da concentração da clorofila a</i>	<i>109</i>
<i>Método da avaliação de parâmetros fotossintéticos utilizando a análise da fluorescência da clorofila a.....</i>	<i>110</i>
Referências Bibliográficas	113

Resumo

Herbicidas podem atingir ambientes aquáticos em regiões agrícolas, afetando os produtores primários e, consequentemente, a teia trófica e a ciclagem de nutrientes. Neste contexto, macroalgas lólicas do filo Chlorophyta foram coletadas, cultivadas, e submetidas a três concentrações diferentes (0,28; 3,5; e 6 mg L⁻¹) de glifosato grau técnico e da formulação comercial Roundup®, e uma concentração (0,03 mg L⁻¹) de ácido aminometilfosfônico (AMPA), além do grupo controle (0 mg L⁻¹), para a avaliação da resposta fotossintética através da evolução do oxigênio dissolvido, da fluorescência da clorofila *a*, e da concentração de clorofila *a*, realizados após um e sete dias de exposição ao herbicida. Os resultados mostram que, no geral, o Roundup® foi o herbicida que mais afetou negativamente as respostas fotossintéticas das macroalgas testadas, gerando danos ao aparato fotossintético, provocando reduções na taxa de fotossíntese líquida, e na concentração de clorofila *a*. O glifosato grau técnico e o AMPA também causaram efeitos inibitórios significativos para a resposta fotossintética, ainda que em uma escala menor. Em relação às concentrações utilizadas, a concentração de 0,28 mg L⁻¹, que corresponde ao limite permitido pela legislação brasileira para a água destinada a irrigação e consumo animal, gerou reduções efetivas na resposta fotossintética de *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Roundup®) *Nitella subglomerata* (glifosato grau técnico e Roundup®) e *Desmidium grevillei* (Roundup®). A concentração de 0,03 mg L⁻¹ utilizada no tratamento com AMPA também inibiu a resposta fotossintética de *Oedogonium* sp. e *Spirogyra* sp. Em um segundo experimento, as mesmas análises foram utilizadas para avaliar a mistura de herbicidas glifosato (Roundup®) e ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (Bratt®) nas concentrações recomendadas pelos fabricantes (3,5 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹, respectivamente). Neste experimento, a mistura destes herbicidas gerou poucos efeitos significativos na resposta fotossintética quando comparado aos resultados do tratamento com Roundup®, sugerindo haver um efeito antagônico para a maioria das macroalgas estudadas. De modo geral, os resultados de ambos os experimentos indicam que a forma como o herbicida glifosato se apresenta para as macroalgas testadas no ambiente aquático (e.g. na presença do surfactante, degradado em AMPA, combinado com o 2,4-D), pode gerar flutuações na produtividade (inibição ou estímulo) ao longo do tempo de modo táxon-específico, ressaltando a necessidade de mais estudos sobre os efeitos de possíveis contaminantes ambientais em produtores primários de ambientes aquáticos.

Palavras-chave: glifosato, AMPA, 2,4-D, fotossíntese, macroalgas verdes.

Abstract

Herbicides can contaminate aquatic environments in agricultural regions, affecting primary producers and, consequently, the food web and nutrient cycling. In this context, lotic macroalgae of the phylum Chlorophyta were collected and cultivated in three different concentrations (0.28; 3.5; and 6 mg L⁻¹) of technical grade glyphosate and Roundup®, and one concentration (0.03 mg L⁻¹) of aminomethylphosphonic acid (AMPA), in addition to the control group (0 mg L⁻¹). Were evaluated the photosynthetic response through the oxygen evolution, chlorophyll *a* fluorescence, and the chlorophyll *a* concentration, performed with one and seven days of exposure to the herbicide. The results show that, in general, Roundup® was the herbicide most negatively affected the photosynthetic responses of macroalgae tested, causing damage to the photosynthetic apparatus, reducing the photosynthetic rates, and chlorophyll *a* concentration. Technical grade glyphosate and AMPA likewise caused significant inhibitory effects on the photosynthetic response, although on a smaller scale. About the concentrations used, the 0.28 mg L⁻¹, which correspond to the limit for Brazilian law in water for irrigation and animal consumption, led to effective reductions in the photosynthetic response of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Roundup®) *Nitella subglomerata* (glyphosate technical grade and Roundup®) and *Desmidium grevillei* (Roundup®). The concentration of 0.03 mg L⁻¹ used in the AMPA treatment also inhibited the photosynthetic response of *Oedogonium* sp. and *Spirogyra* sp. In a second experiment, the same analyses were performed for a mixture of herbicides glyphosate (Roundup®) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Bratt®) at the recommended concentration to control weeds (3.5 mg L⁻¹ and 2.0 mg L⁻¹, respectively). In this experiment, the mixture of these herbicides, when comparing the results with the Roundup® treatment, caused few effects on the photosynthetic response, suggesting an antagonistic effect for most of the macroalgae studied. In general, the results of both experiments, indicate that the form that these herbicides take in the environment (e.g. with surfactant, degraded in AMPA, combined with 2,4-D), can generate fluctuations (inhibition or stimulation) on productivity over time in taxon-specific variation, highlighting the need for further studies on the effects of possible environmental contaminants on primary producers of aquatic environments.

Key words: glyphosate, AMPA, 2,4-D, photosynthesis, green macroalgae.

Introdução Geral

A alta demanda de alimentos, decorrente do grande crescimento da população mundial, impulsiona cada vez mais às práticas agrícolas intensivas que visam o aumento da produtividade (Galli & Montesuma, 2005; Green *et al.*, 2005; Kleijn *et al.*, 2009). O controle de pragas na agricultura passou a ser uma necessidade, e a aplicação de pesticidas tornou-se uma das principais ferramentas utilizadas para atingir este objetivo (Jurado *et al.*, 2011; Price & Kelton, 2011). Os pesticidas podem ser classificados de acordo com o grupo alvo de sua ação como sendo inseticidas, fungicidas e herbicidas, por exemplo (Jurado *et al.*, 2011). Estes últimos, herbicidas, são responsáveis por eliminar do agrossistema as plantas que não apresentam interesse econômico (daninhas), e que competem por espaço e nutrientes com as demais cultiváveis (Galli & Montesuma, 2005; Green *et al.*, 2005; Kleijn *et al.*, 2009).

Os herbicidas correspondem a classe de pesticidas mais utilizada na agricultura, entretanto, a utilização de substâncias químicas no controle de plantas indesejáveis não é uma prática empregada somente na agricultura (Jurado *et al.*, 2011). Por muitos anos foram utilizados resíduos de petróleo, minérios de arsênico, ácido sulfúrico, e sais de cobre para o controle de plantas que cresciam sobre as linhas de trem, uma vez que estas substâncias matavam todas as plantas e mantinham um efeito residual no solo por vários meses, ou até mesmo anos (Jurado *et al.*, 2011).

Na agricultura, entretanto, os herbicidas seletivos tendem a ser comercialmente mais vantajosos por permitirem que somente as plantas cultivadas sobrevivam. A seletividade pode ser baseada em diferenças morfológicas, como por exemplo no tamanho e na textura das folhas, que influencia diretamente na quantidade de herbicida que é absorvido ou escoado para o solo; em diferenças bioquímicas, que podem determinar se a planta possui ou não a capacidade de metabolizar o herbicida, não sendo portanto suscetível aos efeitos deletérios; ou ainda toponômica, quando o herbicida é administrado de forma a entrar em contato somente com a planta daninha (Jurado *et al.*, 2011; Carvalho, 2013).

O controle químico seletivo foi iniciado com a produção do ácido 2,4 – diclorofenoxiacético (2,4-D), em 1941, durante a segunda guerra mundial, sendo anunciado publicamente somente ao final da guerra e utilizado comercialmente, nos EUA, a partir de 1947 (Jurado *et al.*, 2011; Oliveira Jr., 2011). Com a chegada dos herbicidas seletivos ao mercado, foi possível aumentar a produtividade e, concomitantemente, reduzir a mão de obra necessária para o controle das plantas daninhas, que antes era realizada de forma manual (Price & Kelton,

2011). Estes benefícios gerados pelo controle químico, provavelmente, estimularam o aumento das pesquisas na área de desenvolvimento de novos herbicidas (Jurado *et al.*, 2011).

De fato, com o advento da técnica de transgenia na década de 1990, foi possível alcançar um nível maior de seletividade. A combinação de herbicidas não seletivos, como o glifosato e o glufosinato, com plantas que adquiriram resistência por meio da transgenia, permitiu a utilização desses herbicidas em pós emergência, o que gerou uma redução ainda maior dos custos com resultados mais efetivos (Derpsch & Friedrich, 2009).

Outro avanço necessário para a utilização comercial dos herbicidas residiu no aumento da capacidade do ingrediente ativo em alcançar o local preciso onde na planta ocorre o seu mecanismo de ação, ou seja, no órgão vegetal em que ele provoca a lesão biofísica e/ou bioquímica que impede (ou reduz) o seu desenvolvimento. Para obter tal eficiência, os herbicidas têm sido comercializados em formulações que apresentam, além do ingrediente ativo, adjuvantes (ex. surfactantes) que, embora não apresentem propriedade fitossanitária, agem de modo a garantir a estabilidade da solução e aumentar a eficiência do ingrediente ativo (Carvalho, 2013).

Historicamente, soluções contendo sabão e óleo de origem animal foram utilizados como adjuvantes na agricultura antes de 1900 (Gillette, 1888; Hazen, 2000). Graças aos avanços nas pesquisas, hoje existem adjuvantes para as mais diversas funções, como por exemplo os surfactantes, que reduzem a tensão superficial dos líquidos; os quelatizantes, responsáveis por isolarem as cargas elétricas, suprimindo a reatividade dos íons; os espessantes, que aumentam a viscosidade; e os tamponantes, que mantêm o pH dentro da faixa desejada (Carvalho, 2013).

No Brasil, existem hoje cerca de 149 ingredientes ativos de herbicidas, classificados em 25 grupos de mecanismos de ação, que são vendidos na forma de 636 formulações comerciais (MAPA, 2017), sendo o glifosato o ingrediente ativo mais utilizado no Brasil, alcançando a marca de 194,8 mil toneladas vendidas no ano de 2014 (IBAMA, 2016).

O glifosato, ou N-(fosfonometil) glicina, desenvolvido e inicialmente comercializado pela empresa Monsanto na década de 1970, é um herbicida não seletivo pós-emergente muito utilizado mundialmente no controle de ervas daninhas e de espécies invasoras (Woodburn, 2000; Papchenkova *et al.*, 2009).

A popularização da técnica de plantio direto, ao qual o processo de semeadura é realizada sob uma cobertura vegetal morta, ajudou a disseminar inicialmente o uso do glifosato no período de pré-plantio para o dessecamento das plantas daninhas (Pérez *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2013). Entretanto, foi com o avanço das pesquisas em transgenia que o glifosato realmente se consolidou no mercado (Price & Kelton, 2011). O Brasil concentra atualmente

cerca de 23% da área cultivada com culturas transgênicas do mundo, sendo a cultura da soja resistente ao glifosato a grande responsável pela popularização desse herbicida no país (Wagner *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2016).

Com o fim da patente do Roundup® e o aumento das áreas cultivadas com plantas tolerantes ao glifosato, o número de formulações comerciais de herbicidas à base de glifosato aumentou (Duke & Powles, 2008). Estas formulações, além de variarem na concentração de glifosato, variam em relação a concentração e a identidade do(s) adjuvante(s) utilizado(s). E, em geral, a identidade do adjuvante não é apresentado pelo fabricante, o que dificulta as pesquisas sobre substâncias que compõe a formulação comercial (Howe *et al.*, 2004; Annet *et al.*, 2014).

O glifosato, por ser um derivado do aminoácido glicina, apresenta uma alta solubilidade em água (11,6 g L⁻¹ a 25°C) e é insolúvel a solventes orgânicos como etanol e acetona. No entanto, os fabricantes optam por utilizar o glifosato na forma de sais de amônio, dimetil amônio, potássio, isopropilamina ou trimesium, por apresentarem uma solubilidade em água muito maior (Székács & Darvas, 2012). O Roundup® apresenta o glifosato na forma de sal de isopropilamina e, por essa razão, a concentração de glifosato expressa na bula do produto é referido em termos de ácido equivalente.

As formulações comerciais de glifosato apresentam também diversos surfactantes não iônicos que atuam como facilitadores na absorção do glifosato pela planta (Hazen, 2000) e, assim como todos os adjuvantes presentes em formulações comerciais, são considerados inertes. Entretanto, o surfactante polioxietileno amina (POEA) é apontado como responsável pelo aumento da toxicidade da formulação comercial quando comparada com o glifosato puro (Powell *et al.*, 1991; Giesy *et al.*, 2000; Tsui & Chu, 2003; Székács & Béla Darvas, 2012; Battaglin *et al.*, 2014). Em decorrência dessa discrepância entre formulação comercial e ingrediente ativo, em 1996, a empresa Monsanto foi obrigada pela justiça americana a retirar de seus anúncios os termos “*environmentally friendly*” e “*biodegradable*” (Székács & Darvas, 2012). No entanto, a persistência do POEA em ambientes aquáticos é pouco estudada, pois a metodologia para quantificar esse surfactante ainda está em processo de consolidação, embora estudos recentes tenham demonstrado que a meia vida do POEA na coluna d’água seja baixa (13 – 18h - Wang *et al.*, 2005; 3,2 – 5,3h - Rodriguez-Gil *et al.*, 2017).

A preocupação com os efeitos nocivos de herbicidas a base de glifosato em vertebrados tem crescido nos últimos anos, uma vez que em trabalhos recentemente publicados há relatos de que o glifosato pode desencadear efeitos teratogênicos (Paganelli *et al.*, 2010) e induzir o estresse oxidativo (El-Shenawy, 2009; Astiz *et al.*, 2012). Em 2015, a Agência Internacional de

Pesquisa sobre o Câncer classificou o glifosato como provável carcinogênico para os seres humanos (IARC, 2015), embora a agência europeia "*European Food Safety Authority*", após a reavaliação do glifosato, tenha concluído que é improvável que o glifosato seja carcinogênico (EFSA, 2015).

O processo de degradação do glifosato é mediado predominantemente por bactérias (Giesy *et al.*, 2000), que dependendo da espécie envolvida, pode ocorrer via desfosforilação ou descarboxilação. Na via de desfosforilação, o metabólito intermediário gerado é a glicina, já na via de descarboxilação, o metabólito intermediário é o ácido aminometilfosfônico (AMPA), sendo esta via a mais comum. (Giesy *et al.*, 2000, Székács & Darvas, 2012).

O tempo de degradação do AMPA, que resulta na formação de água, dióxido de carbono e fosfato inorgânico, tende a ser superior ao tempo de degradação do glifosato em AMPA, o que explica o fato do AMPA ser detectado no ambiente com maior frequência em relação ao glifosato (Székács & Darvas, 2012; Battaglin *et al.*, 2014; Poiger *et al.*, 2017). De fato, a presença do AMPA em ambientes aquáticos próximos a áreas agricultáveis pode indicar um evento de contaminação por glifosato (Battaglin *et al.*, 2005), no entanto, o AMPA pode ser gerado também a partir da degradação de detergentes oriundos de resíduos industriais e domésticos (Jaworska *et al.*, 2002). Embora seja pouco estudado, o AMPA também é considerado um herbicida, tendo seus próprios efeitos inibitórios sobre a síntese de clorofila, ampliado assim os efeitos indiretos do glifosato (Gomes *et al.*, 2014).

O glifosato tem uma alta capacidade de sorção, podendo se ligar no solo com cátions (p.ex., Al^{3+} e Fe^{3+}) através de ligações covalente ou com substâncias húmicas pela formação de pontes de hidrogênio (Yamada & Castro, 2007). No entanto, a adsorção do glifosato no solo depende também do pH, cujo aumento determina uma menor adsorção do herbicida, e da concentração de fosfato, que compete com o glifosato pelos mesmos sítios de ligação (Yamada & Castro, 2007; Székács & Darvas, 2012; Nguyen *et al.*, 2016). Quando o glifosato se encontra adsorvido no solo, ele se torna indisponível para as comunidades bacterianas, o que acaba por aumentar seu tempo de degradação (Veiga *et al.*, 2001; Yamada & Castro, 2007). Outros fatores também afetam o tempo de degradação do glifosato pelas comunidades bacterianas, como temperatura, humidade, e a própria composição dessas comunidades em relação a proporção de microrganismos capazes de degradá-lo (Székács & Darvas, 2012; Annet *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2016).

O glifosato é absorvido através das folhas e tende a ser translocado via simplasto até os tecidos meristemáticos da planta (Pérez *et al.*, 2011). Sua ação reside na via metabólica da síntese de aminoácidos aromáticos por meio de inibição competitiva com a enzima EPSPs (5-

enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase), presente em plantas, fungos e bactérias, bloqueando a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, e causando acúmulo de ácido chiquímico e de ácidos hidroxibenzóicos nas plantas (Devine *et al.*, 1993; de María *et al.*, 2006; Forlani *et al.*, 2008; Sáenz & Di Marzio, 2009) (Fig. 1). A interrupção dessa via metabólica acaba por inibir a produção de importantes metabólitos secundários como a vitamina K, tetrahydrofolato, ubiquinona, antocianinas, lignina, compostos fenólicos, e fitoalexinas responsáveis pela proteção da planta a infecções (Yamada & Castro, 2007; Gomes *et al.*, 2014). Os efeitos do glifosato tornam-se visíveis nas plantas através dos primeiros quadros de clorose, que evoluem para a necrose, podendo ocorrer também deformidade nas folhas e nas raízes (Henry *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2011).

Uma série de efeitos secundários desencadeados pelo glifosato tem sido reportado em muitos trabalhos (Yamada & Castro, 2007; Zobiole *et al.*, 2012; Serra *et al.* 2013; Gomes *et al.*, 2014). Por se acumular em tecidos com alta atividade metabólica, o glifosato pode causar a inibição da biossíntese do ácido indolilacético e interferir no crescimento da planta (Yamada & Castro, 2007; Gomes *et al.*, 2014). Até mesmo a formação de nódulos em leguminosas pode ser afetada em decorrência das alterações metabólicas geradas pelo glifosato (de María *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014). O glifosato pode ainda se ligar a cátions como Ca^{+2} , Fe^{+3} e Mn^{+2} graças a sua alta capacidade de sorção, o que, conseqüentemente, acarreta na inibição dos processos de translocação desses nutrientes (Su *et al.* 2009; Zobiole *et al.*, 2012); causar o aumento do estresse oxidativo em decorrência da inibição da síntese de aminoácidos aromáticos (Serra *et al.* 2013; Gomes *et al.*, 2014); e reduzir a formação de microtúbulos, retardando a divisão celular, levando a núcleos com aparência lobada e causando malformações nos cloroplastos (Campbell *et al.*, 1976; Vaughn & Duke, 1986).

Dentre os efeitos produzidos pelo glifosato, certamente, um dos mais relevantes se relaciona com o processo fotossintético. Na fotossíntese, este herbicida tende a reduzir a taxa fotossintética das plantas por gerar um desvio de carbono para a síntese do chiquimato. Após a inibição da enzima EPSPs, o arogenato, inibidor alostérico da enzima 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), deixa de ser produzido, gerando uma constante utilização de eritrose-4-fosfato nesta via metabólica e, conseqüentemente, deixando de atuar na regeneração da ribulose-1,5-bifosfato no ciclo de Calvin (Geiger *et al.*, 1986; 1987; Shieh *et al.*, 1991) (Fig. 1). Adicionalmente, a interrupção da síntese do chiquimato reduz a síntese de proteínas associadas ao fotossistema II (PSII), causando uma redução na taxa de transporte de elétrons, na eficiência efetiva do PSII, na concentração de NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e NADPH (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) e aumento da

dissipação de energia não fotoquímica (Vivancos *et al.*, 2011; Yanniccari *et al.*, 2012) (Fig. 1). Outros efeitos indiretos do glifosato na fotossíntese correspondem a inibição da síntese de diversos compostos como carotenoides, clorofila, ácidos graxos e aminoácidos (Yamada & Castro, 2007; Vera *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2014; 2017).

Em relação a redução na concentração de clorofila gerada pelo glifosato, este herbicida pode atuar de forma direta na degradação da clorofila em feofitina através da formação de espécies reativas de oxigênio (Gomes *et al.*, 2017), ou atuar de forma indireta através da formação de AMPA, que é o responsável pela inibição da síntese do ácido 5-aminolevulínico (ALA), um precursor da biossíntese da clorofila (Siqueira *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2014; 2017).

O grande aumento na utilização do glifosato durante os últimos anos, impulsionado pela introdução de culturas tolerantes ao glifosato e também pela queda da patente no ano 2000, gerou uma pressão seletiva sobre as plantas daninhas ocasionando a seleção de biótipos resistentes ao herbicida (Christoffoleti, 2001; Duke & Powles, 2008; Christoffoleti & Nicolai, 2016). Desde o primeiro caso de resistência ao glifosato registrado em 1996 para *Lolium rigidum* na Austrália (Pratley *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2011), o número de plantas resistentes vem crescendo a cada ano (Pérez *et al.*, 2011; Christoffoleti & Nicolai, 2016). Atualmente, existem cerca de 279 biótipos resistentes ao glifosato, dos quais 12 estão presentes no Brasil (Heap, 2017).

Os mecanismos que conferem resistência ao glifosato podem estar relacionado com a modificação estrutural da enzima EPSPs, com o translocamento do herbicida na planta e com o aumento da produção da enzima EPSPs (Gaines *et al.*, 2010; Powles & Yu, 2010; Price & Kelton, 2011; Christoffoleti & Nicolai, 2016).

A enzima EPSPs pode sofrer mutações que afetam o sítio de ligação com o glifosato, reduzindo sua afinidade com o herbicida (Christoffoleti & Nicolai, 2016). Caso a mutação não inviabilize o bom funcionamento da enzima, o biótipo resistente pode sobreviver a uma concentração de herbicida até cinco vezes maior que a concentração necessária para matar o biótipo suscetível (Baerson *et al.*, 2002). Já o aumento da produção de enzima EPSPs, relacionado com a superexpressão gênica também pode conferir aspectos de resistência ao glifosato à planta (Gaines *et al.*, 2010), embora o nível de resistência seja relativamente baixo (Vencill *et al.*, 2011). Em relação ao translocamento do herbicida dentro da planta, já foram reportadas mudanças do padrão observado em biótipos resistentes quando comparados a biótipos suscetíveis. Em um estudo com *Lolium rigidum*, verificou-se que os biótipos suscetíveis tendem a apresentarem uma maior concentração de glifosato nos tecidos das raízes,

enquanto que os biótipos resistentes mantinham o glifosato nas pontas das folhas (Lorraine-Colwill *et al.*, 2002). Outra forma de resistência relacionada ao translocamento diferenciado do herbicida em biótipos resistentes consiste no acúmulo de glifosato dentro do vacúolo das células, impedindo que o mesmo atinja seu local de ação (Ge *et al.*, 2010; Vencill *et al.*, 2011).

Em decorrência do número crescente de biótipos resistentes no Brasil e no mundo, a utilização de herbicidas a base de glifosato deve ser cada vez mais racionalizada dentro de sistema de manejo de modo a prevenir o surgimento de novos biótipos (Christoffoleti & López-Ovejero, 2008; Christoffoleti & Nicolai, 2016). Estas medidas preventivas visam a redução da pressão de seleção sobre as plantas daninhas, através da rotação de cultura, rotação de herbicidas e da utilização conjunta de herbicidas de mecanismos de ação distintos (Christoffoleti & Nicolai, 2016). Em regra, quando as plantas daninhas resistentes ao glifosato estão presentes nas áreas de cultivo, a aplicação conjunta de glifosato com outro herbicida de mecanismo de ação distinto é uma das medidas mais empregadas por produtores rurais (Christoffoleti & López-Ovejero, 2008; Christoffoleti & Nicolai, 2016).

Entre os herbicidas que podem ser usados em conjunto com o glifosato, existem os mimetizadores de auxinas, como o herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) que pode ser utilizado em mistura com o glifosato em aplicações de dessecação no período de pré-plantio (Moreira *et al.* 2007; Takano *et al.*, 2013). O 2,4-D, por conta deste tipo de manejo, é o segundo herbicida mais vendido no Brasil (IBAMA, 2016). O 2,4-D é utilizado em dicotiledôneas, gerando inicialmente anomalias de crescimento e aumento na concentração de clorofila, culminando em danos aos cloroplastos e alterações no processo de respiração e fotossíntese pela formação de espécies reativas de oxigênio (Christoffoleti & López-Ovejero, 2008; Grossmann, 2010).

Formulações comerciais contendo o glifosato como princípio ativo são consideradas "ambientalmente seguras", porque o glifosato é fortemente adsorvido pelo solo e rapidamente degradado por microrganismos, o que supostamente evitaria que o mesmo fosse absorvido por plantas não-alvo ou escoado para águas subterrâneas e superficiais (Giesy *et al.*, 2000; Solomon & Thompson, 2003). No entanto, condições naturais inadequadas para a aplicação do herbicida, como precipitações ocorrendo poucos dias após o manejo e/ou fortes rajadas de vento capazes de levar o herbicida pulverizado até os ambientes aquáticos adjacentes, ou mesmo falhas humanas durante a aplicação podem gerar reduções no número de espécies e influenciar os padrões de fluxo de energia e a ciclagem de nutrientes desses ecossistemas (Blasioli *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2011; Battaglin *et al.*, 2014; Magbanua *et al.*, 2016).

Não são apenas os ambientes aquáticos adjacentes a áreas agrícolas que estão suscetíveis aos eventos de contaminação por herbicidas a base de glifosato. Este herbicida também é muito utilizado no manejo de gramados e jardins (Battaglin *et al.*, 2014; Annet *et al.*, 2016; Poiger *et al.*, 2017), podendo ser encontrado em concentrações semelhantes aos reportados para os riachos em áreas agrícolas (Mahler *et al.*, 2017).

A concentração de glifosato na água permitida por lei varia de acordo com o país em questão. Os EUA limitam a concentração de glifosato na água a $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ (United States Environmental Protection Agency, 2009), enquanto que a Comunidade Econômica Europeia estabelece a concentração máxima isolada em $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ e a concentração máxima da mistura de agrotóxicos em $0,0005 \text{ mg L}^{-1}$ (European Union, 1998). No Brasil, o limite de concentração de glifosato na água, estabelecido pela resolução nº357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, para as categorias de água doce nas classes I e II (destinadas ao consumo humano) corresponde a $0,065 \text{ mg L}^{-1}$ e para água doce na classe III (destinada a irrigação e ao consumo animal) $0,28 \text{ mg L}^{-1}$ (CONAMA, 2005). Por sua vez, o Ministério da Saúde, na portaria nº 2914 publicada em 2011, estabelece para o padrão de potabilidade da água o valor máximo permitido de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato e AMPA em conjunto (Ministério da Saúde, 2011).

Os surfactantes presentes em herbicidas à base de glifosato (p.ex., POEA) não são indicados para aplicações em ambientes aquáticos, por isso formulações comerciais sem a presença de surfactantes (p.ex., Rodeo[®]) são utilizados na Europa, nos EUA e no Canadá (Annet *et al.*, 2014; Rodriguez-Gil *et al.*, 2017). Mas a partir da Resolução CONAMA nº 467 (2015) publicada em 17 de julho de 2015, que “dispõe sobre critérios para a autorização de uso de produtos ou de agentes de processos físicos, químicos ou biológicos para o controle de organismos ou contaminantes em corpos hídricos superficiais e dá outras providências”, a utilização de formulações comerciais a base de glifosato (e de qualquer outro herbicida) torna-se possível, ainda que esta formulação comercial contenha surfactantes (Pompêo, 2017). Além disso, esta resolução não prioriza o controle adequado das fontes poluentes que chegam até os corpos d’água (p.ex., resíduos industriais ou esgoto doméstico) onde ocorre o crescimento excessivo dos organismos indesejados e nem define quais organismos podem ser controlados (p.ex., nativos ou invasores) (Pompêo, 2017).

Alguns estudos que avaliaram o efeito do glifosato grau técnico (princípio ativo) e/ou da mistura entre o glifosato e surfactantes (formulação comercial) sobre os produtores primários de ambientes aquáticos são encontrados na literatura. Por exemplo, já foram reportados efeitos do glifosato sobre a composição de pigmentos fotossintetizantes (Pérez *et al.*, 2007; Issa *et al.*, 2013; Vera *et al.*, 2014) e sobre a taxa fotossintética em microalgas de ambientes lóticos (Sáenz

& Di Marzio, 2009). Há ainda estudos que demonstraram que, mesmo em concentrações baixas, herbicidas podem afetar o crescimento do microalgas em ambientes lênticos (Boutin *et al.*, 2000), e de macroalgas marinhas. (Kittle III & McDermid, 2016). Para as macrófitas, há registros de um amplo intervalo de sensibilidade quando se considera diferentes organismos (Peterson *et al.*, 1994; Michel *et al.*, 2004). Sobrero *et al.* (2007) constataram uma redução na taxa de crescimento da macrófita *Lemna gibba* quando exposta a uma concentração de 1 mg L⁻¹ de glifosato. Já em briófitas, um estudo de longa duração constatou uma forte redução na abundância e riqueza de espécies sob efeito de altas concentrações de glifosato no meio (Newmaster *et al.*, 1999). Além disso, os autores verificaram que o efeito do herbicida sob estas comunidades é duradouro, uma vez que o início da recuperação das condições encontradas na comunidade antes da sua aplicação ocorreu apenas quatro anos após o término do experimento.

Em relação às algas bentônicas dulciaquícolas, foram realizados trabalhos majoritariamente envolvendo microalgas perifíticas, e o resultado destes estudos sugerem que diferentes respostas ao glifosato são observadas dependendo do filo algal analisado. Assim, o efeito do glifosato pode, por exemplo, ser negativo para a comunidade perifítica, afetando significativamente a composição original destas comunidades ao reduzir o percentual de cobertura das diatomáceas nele presente (Forlani *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2010). Em um outro estudo realizado em mesocosmos para verificar os efeitos do Glifosato Atanor® sobre a comunidade perifítica, constatou-se o favorecimento do crescimento de algas verdes filamentosas dos gêneros *Oedogonium* e *Mougeotia* e, principalmente, de cianobactérias (Vera *et al.*, 2012).

De fato, há diversos estudos que evidenciam a capacidade de tolerância das cianobactérias ao glifosato (Powell *et al.*, 1991; Forlani *et al.*, 2008; 2015). Estas algas podem apresentar mecanismos de defesa que incluem: baixa permeabilidade das células ao glifosato; reconhecimento do glifosato como um substrato por parte de algumas enzimas hidrolíticas, ainda que de forma pouco eficiente, e a presença da forma monomérica da enzima EPSPs em algumas espécies, que se mostra mais tolerante em relação à forma homodimérica (Forlani *et al.*, 2008; 2015). Do mesmo modo, a alga verde *Scenedesmus vacuolatus* teve o seu crescimento estimulado quando submetida a baixas concentrações de glifosato (Daouk *et al.*, 2013). Provavelmente, esse aumento na taxa de crescimento está relacionado ao aumento da concentração de fósforo gerado no processo de degradação do herbicida (Forlani *et al.*, 2008; Daouk *et al.*, 2013). A esse efeito estimulador de crescimento proporcionado por baixas concentrações de herbicidas é atribuído o termo hormese (Cedergreen *et al.*, 2007; Sáenz & Di Marzio, 2009; Belz & Duke, 2014).

Para o grupo das macroalgas de ambientes lóticos, existe uma grande escassez de estudos que avaliem o impacto do glifosato nestes produtores primários. Contudo, um estudo publicado recentemente sobre a avaliação da resposta fotossintética da macroalga verde *Nitella microcarpa* var. *wrightii* H. Groves & J. Groves submetida a herbicidas a base de glifosato mostrou que sua produtividade pode sofrer variações ao longo do tempo em decorrência de um evento de contaminação ambiental por glifosato (Oliveira *et al.*, 2016). Este efeito na produtividade mostra-se preocupante, uma vez que, as macroalgas verdes, tendem a formarem as comunidades mais dominantes e mais diversas, principalmente em ambientes com alta irradiância (Necchi, 2004; Oliveira *et al.*, 2013; Peres *et al.*, 2017). Em decorrência dessa alta representatividade, estes produtores primários desempenham um papel fundamental na manutenção da cadeia trófica dos ambientes lóticos, e qualquer efeito negativo na produtividade dessas macroalgas pode ser desastroso para a manutenção desses ecossistemas (Sheath & Burkholder 1985, Stevenson, 1996; Okada & Watanabe, 2002).

Justificativa e Objetivos

Considerando (i) o risco já relatado em diversos estudos que mostram que o glifosato não é totalmente adsorvido pelo solo e pode alcançar os ambientes aquáticos (Legris & Couture, 1989; Newton *et al.*, 1994; Couture *et al.*, 1995; Battaglin *et al.*, 2005; 2014), (ii) o potencial risco da presença de AMPA nesses ambientes e (iii) a tendência no aumento da utilização da mistura entre glifosato e outros herbicidas de diferentes mecanismos de ação (Christoffoleti & López-Ovejero 2008; Takano *et al.*, 2013; Christoffoleti & Nicolai, 2016), estudos que avaliem o efeito tóxico potencial do glifosato, sobre as macroalgas lóticas, especialmente as verdes, tornam-se extremamente relevantes para a compreensão da dinâmica ecológica destas comunidades em particular e dos ecossistemas lóticos como um todo. Em adição, investigações dessa natureza podem viabilizar a utilização desses organismos no biomonitoramento de ambientes aquáticos impactados.

Assim, este trabalho teve por objetivos: i) avaliar o impacto do glifosato grau técnico, da formulação comercial Roundup®, e do AMPA sobre as macroalgas verdes de ambientes lóticos (*Nitella microcarpa* var. *wrightii* H. Groves & J. Groves, *Oedogonium* sp., *Nitella subglomerata* A. Braun, *Spirogyra* sp., e *Desmidium grevillei* (Kützinger ex Ralfs) De Bary) (Fig. 2) por meio do monitoramento de dados da produtividade primária (taxa fotossintética líquida e respiração no escuro), de determinados parâmetros oriundos da fluorescência da clorofila *a* (rendimento quântico efetivo do PSII - Φ_{PSII} , “quenching” fotoquímico - qP, dissipação de calor no complexo antena do PSII - D, e dissipação de calor pelo centro de reação do PSII - E) e da

concentração de clorofila *a*; ii) comparar os dados mensurados para cada espécie de forma a identificar padrões de respostas, caso existam; iii) analisar os efeitos do uso combinado dos herbicidas Roundup® (glifosato) e Bratt® (2,4-D), uma vez que a administração conjunta de herbicidas de diferentes mecanismos de ação tende a aumentar na agricultura; iv) avaliar o uso potencial destas macroalgas verdes como organismos bioindicadores para a contaminação ambiental pelos herbicidas testados.

As seguintes hipóteses iniciais foram formuladas: i) as respostas experimentais tendem a ser diretamente relacionadas às doses testadas, sendo que, doses menores devem provocar efeitos menos danosos nas respostas fotossintéticas das macroalgas do que doses maiores; ii) a aplicação de herbicidas combinados (ou seja, Roundup® e Bratt®) tende a produzir maiores efeitos danosos sobre as respostas fotossintéticas das macroalgas verdes investigadas e iii) o aumento do tempo de exposição das macroalgas aos herbicidas, assim como as doses testadas, deve gerar o aumento da magnitude dos efeitos inibitórios na resposta fotossintética.

Referências Bibliográficas

Annett, R., Habibi, H.R., & Hontela, A. 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5): 458-479.

Astiz, M., de Alaniz, M.J., & Marra, C.A. 2012. The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. *Neurochemistry international*, 61(7): 1231-1241.

Baerson, S.R., Rodriguez, D.J., Tran, M., Feng, Y., Biest, N.A. & Dill, G.M. 2002. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant physiology*, 129(3): 1265-1275.

Battaglin, W.A., Kolpin, D.W., Scribner, E.A., Kuivila, K.M. & Sandstrom, M.W. 2005. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams, 2002. *Journal of the American Water Resources Association*, 41: 323-332.

Battaglin, W.A., Meyer, M.T., Kuivila, K.M. & Dietze, J.E. 2014. Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. *Journal of the American Water Resources Association*, 50(2): 275-290.

Blasioli, S., Braschi, I. & Gessa, C.E. 2011. The Fate of Herbicides in Soil. In *Herbicides and Environment*, Andreas Kortekamp (Ed.), ISBN: 978-953-307-476-4,

InTech, Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/the-fate-of-herbicides-in-soil>>. Acesso: 11/09/2017.

Belz, R.G. & Duke, S.O. 2014. Herbicides and plant hormesis. *Pest management science*, 70(5): 698-707.

Boutin, C., Lee, H.B., Peart, E.F., Batchaler, P.S. & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulphonylurea herbicide methylsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environmental toxicology and chemistry*, 19: 2532-2541.

Campbell, W.F., Evans, J.O. & Reed, S.C. 1976. Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. *Weed Science*, 22-25.

Carvalho, L. B. 2013. *Herbicidas*, Editado pelo autor, Lages, SC, 62 p.

Cedergreen, N., Streibig, J.C., Kudsk, P., Mathiassen, S.K. & Duke, S.O. 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-response*, 5(2): 150-162.

Christoffoleti, P.J. 2001. Análise comparativa do crescimento de biótipos de picão-preto (*Bidens pilosa*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. *Planta Daninha*, 19: 75-83.

Christoffoleti, P.J. & López-Ovejero, R.F. 2008. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no Mundo. Pedro Jacob Christoffoleti. (Org.). *Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas*. 3 ed. Piracicaba: HRAC-BR, 3-26.

Christoffoleti, P.J. & Nicolai, M. 2016. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no Mundo: 4 ed. Pedro Jacob Christoffoleti & Marcelo Nicolai (Orgs.) Piracicaba: HRAC-BR, 262p.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. Resolução número 357 de 17 de março de 2005.

Couture, G., Legris, J. & Langevin, R. 1995. Evaluation des impacts du glyphosate utilise dans le milieu forestier. Ministere des Ressources Naturelles, Direction de Penvironment forestier, Service du suivi environnemental, Charles- bourg, Quebec, Canada.

Daouk, S., Copin, P.J., Rossi, L., Chèvre, N. & Pfeifer, H.R. 2013. Dynamics and environmental risk assessment of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in a small vineyard river of the Lake Geneva catchment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(9): 2035-2044.

de María, N., Becerril, J.M., García-Plazaola, J.I., Hernández, A., de Felipe, M.R., & Fernández-Pascual, M. 2006. New insights on glyphosate mode of action in nodular

metabolism: Role of shikimate accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2621-2628.

Derpsch, R. & Friedrich, T. 2009. Development and current status of no-till adoption in the world. In *Proceedings on CD, 18th Triennial Conference of the International Soil Tillage Research Organisation (ISTRO)*, June 15-19, 2009, Izmir, Turkey.

Devine, M.D., Duke, S.O. & Fedtke, C. 1993. *Physiology of herbicide action*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Duke, S.O. & Powles, S.B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest management science*, 64(4): 319-325.

EFSA - European Food Safety Authority. 2015. *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate*. EFSA J, 13: 4302

El-Shenawy, N.S. 2009. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(3): 379-385.

European Union. 1998. Directive 98/83/EC of the European Parliament and of the Council of 03 November 1998 relating to the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities* L 0083.

Forlani, G., Bertazzini, M., Barillaro, D. & Rippka, R. 2015. Divergent properties and phylogeny of cyanobacterial 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthases: evidence for horizontal gene transfer in the Nostocales. *New Phytologist*, 205(1): 160-171.

Forlani, G., Pavan M., Gramek, M., Kafarski, P. & Lipok, J. 2008. Biochemical Bases for a Widespread Tolerance of Cyanobacteria to the Phosphonate Herbicide Glyphosate. *Plant and cell physiology*, 49(3): 443-456.

Gaines, T.A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S.T., Shaner, D.L., Nissen, S.J., Patzoldt, W.L., Tranel, P.J., Culpepper, A.S., Grey, T.L., Webster, T.M., Vencill, W.K., Sammons, R.D., Jiang, J., Preston, C., Leach, J.E. & Grey, T.L. 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3): 1029-1034.

Galli, A.J. & Montesuma, M.C. 2005. *Alguns Aspectos da Utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura*, ACADCOM Gráfica e Editora.

Ge, X., d'Avignon, D.A., Ackerman, J.J. & Sammons, R.D. 2010. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest management science*, 66(4): 345-348.

Geiger, D.R., Kapitan, S.W. & Tucci, M.A. 1986. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. *Plant Physiology*, 82(2): 468-472.

Geiger, D.R., Tucci, M.A. & Serviates, J.C. 1987. Glyphosate effects on carbon assimilation and gas exchange in sugar beet leaves. *Plant Physiology*, 85(2): 365-369.

Giesy, J.P., Dobson, S. & Solomon, K.R. 2000. *Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide*. Springer New York, 120p.

Gillette, C.P. 1888. Experiments with arsenites. *Bulletin (Iowa Agricultural Experiment Station)*: 1(3). Disponível em: <<http://lib.dr.iastate.edu/bulletin/vol1/iss10/3>>. Acesso: 08/09/2017.

Gomes, M.P., Le Manac'h, S.G., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lucotte, M., & Juneau, P. 2017. Glyphosate-Dependent Inhibition of Photosynthesis in Willow. *Frontiers in plant science*, 8: 207.

Gomes, M.P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M. & Juneau, P. 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of experimental botany*, 65(17): 4691-4703.

Green, R.E., Cornell, S.J., Scharlemann, J.P.W. & Balmford, A. 2005. Farming and the fate of wild nature. *Science*, 307: 550-555.

Grossmann, K. 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest management science*, 66(2): 113-120.

Hazen, J.L. 2000. Adjuvants—terminology, classification, and chemistry. *Weed Technology*, 14(4): 773-784.

Heap, I. 2017. *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds*. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Summary/ResistbyActive.aspx>>. Acesso: 12/09/2017.

Henry, W.B., Shaner, D.L. & West, M.S. 2007. Shikimate accumulation in sunflower, wheat, and proso millet after glyphosate application. *Weed science*, 55(1): 1-5.

Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K. & Veldhoen, N. 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(8): 1928-1938.

IARC - International Agency for Research on Cancer. 2015. *IARC Monographs Volume 112: Evaluation of Five Organophosphate Insecticides and Herbicides*. IARC, WHO, Lyon, France.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2016. *Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002*. Disponível em:

<<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso: 08/09/2017.

Issa, A.A.E.S., Adam, M.S. & Fawzy, M.A. 2013. Alterations in some metabolic activities of *Scenedesmus quadricauda* and *Merismopedia glauca* in response to glyphosate herbicide. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3(1): 17-23.

Jaworska, J., Van Genderen-Takken, H., Hanstveit, A., van de Plassche, E. & Feijtel, T. 2002. Environmental risk assessment of phosphonates, used in domestic laundry and cleaning agents in the Netherlands. *Chemosphere*, 47(6): 655-665.

Jurado, A., Fernandes, M., Videira, R., Peixoto, F. & Vicente, J. 2011. Herbicides: the face and the reverse of the coin. An in vitro approach to the toxicity of herbicides in non-target organisms. In *Herbicides and Environment*, Andreas Kortekamp (Ed.), ISBN: 978-953-307-476-4, InTech,

Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/herbicides-the-face-and-the-reverse-of-the-coin-an-in-vitro-approach-to-the-toxicity-of-herbicides-i>>. Acesso: 08/09/2017.

Kittle III, R.P. & McDermid, K.J. 2016. Glyphosate herbicide toxicity to native Hawaiian macroalgal and seagrass species. *Journal of Applied Phycology*, 28(4): 2597-2604.

Kleijn, D., Kohler, F., Baldi, A., Batary, P., Concepcion, E.D., Clough, Y., Diaz, M., Gabriel, D., Holzschuh, A., Knop, E., Kovacs, A., Marshall, E.J.P., Tscharntke, T. & Verhulst, J. 2009. On the relationship between farmland biodiversity and land-use intensity in Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276: 903-909.

Legris, J. & Couture, G. 1989. Residus de glyphosate dans l'eau et les sédiments suite a des pulvérisations terrestres en milieu forestier en 1986. Publication #3322. Gouvernement du Québec, Ministère de l'Énergie et des Ressources, Direction de la Conservation, Charlesbourg, Québec, Canada

Lorraine-Colwill, D.F., Powles, S.B., Hawkes, T.R., Hollinshead, P., Warner, S.A.J. & Preston, C. 2002. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 74(2): 62-72.

Magbanua, F.S., Townsend, C.R., Hageman, K.J., Piggott, J.J. & Matthaei, C.D. 2016. Individual and combined effects of fine sediment and glyphosate herbicide on invertebrate drift and insect emergence: a stream mesocosm experiment. *Freshwater Science*, 35(1): 139-151.

Mahler, B.J., Van Metre, P.C., Burley, T.E., Loftin, K.A., Meyer, M.T. & Nowell, L.H. 2017. Similarities and differences in occurrence and temporal fluctuations in glyphosate

and atrazine in small Midwestern streams (USA) during the 2013 growing season. *Science of the Total Environment*, 579, 149-158.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Informações sobre agrotóxicos fitossanitários registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) – AGROFIT*. Disponível em:

<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso: 08/09/2017.

Michel, A., Johnson, R.D., Duke, S.O. & Scheffler, B.E. 2004. Dose-response relationships between herbicides with different modes of action and growth of *Lemna paucicostata*: an improved ecotoxicological method. *Environmental toxicology and Chemistry*, 23: 1074-1079.

Ministério da Saúde, 2011. Portaria nº 2914. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso: 19/07/2017.

Moreira, M.S., Nicolai, M., Carvalho, S.J.P. & Christoffoleti, P.J. 2007. Resistência de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. *Planta Daninha*, 25(1): 157-164.

Necchi, O.Jr. 2004. Light-related photosynthetic characteristics of lotic macroalgae. *Hydrobiologia* 525: 139-155.

Newmaster, S.G.; Bell, F.W. & Vitt, D.H. 1999. The effects of glyphosate and triclopyr on common bryophytes and lichens in northwestern Ontario. *Canadian Journal of Forest Research*, 29(7): 1101-1111.

Newton, M., Horner, L.H., Cowell, J.E., White, D.E. & Cole E. C. 1994. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American forests. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42: 1795-1802.

Nguyen, D.B., Rose, M.T., Rose, T.J., Morris, S.G., & Van Zwieten, L. 2016. Impact of glyphosate on soil microbial biomass and respiration: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 92: 50-57.

Oliveira, R.C., Boas, L.K.V. & Branco, C.C.Z. 2016. Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae). *Phycologia*, 55(5): 577-584.

Oliveira, R.C., Tonetto, A.F., Peres, C.K. & Branco, C.C.Z. 2013. The influence of landscape on the spatial and temporal distribution of stream macroalgal communities of two types of subtropical biomes. *Limnetica*, 32(2): 287-302.

Oliveira Jr., R.S. 2011. Introdução ao Controle Químico. In *Biologia e Manejo de plantas daninhas*, Rubem Silvério de Oliveira Jr, Jamil Constantim & Miriam Hiroko Inoue (Eds.), ISBN: 978-85-64619-02-9, Omnipax, Curitiba, PR, Brasil, pp 125-140.

Okada, H. & Watanabe, Y. 2002. Effect of physical factors on the distribution of filamentous green algae in the Tama River. *Limnology* 3:121-126.

Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S.L. & Carrasco, A.E. 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical research in toxicology*, 23(10): 1586-1595.

Papchenkova, G.A., Golovanova, I.L. & Ushankova, N.V. 2009. The parameters of reproduction, sizes and activities of hydrolases in *Daphnia magna* Straus of successive generation saffected by Roundup herbicide. *Inland Water Biology*, 2(3): 286-291.

Peres, C.K., Tonetto, A.F., Garey, M.V. & Branco, C.C.Z. 2017. Canopy cover as the key factor for occurrence and species richness of subtropical stream green algae (Chlorophyta). *Aquatic Botany*, 137, 24-29.

Pérez, G.L., Vera, M.S. & Miranda, M. 2011. Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. In *Herbicides and Environment*, Andreas Kortekamp (Ed.), ISBN: 978-953-307-476-4. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/herbicides-andenvironment/effects-of-herbicide-glyphosate-and-glyphosate-based-formulations-on-aquatic-ecosystems>> Acesso: 02/05/2013.

Peterson, H.G., Boutin C., Martin, P.A., Freemark, K., Ruecker, N.J. & Moody, M.J. 1994. Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquatic Toxicology*, 28: 275-292.

Poiger, T., Buerge, I.J., Bächli, A., Müller, M.D. & Balmer, M. E. 2017. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2): 1588-1596.

Pompêo, M. 2017. *Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas em reservatórios tropicais brasileiros*, Pompêo, M. (Ed.), Instituto de Biociências da USP, São Paulo, Brasil, 138 pp.

Powles, S.B., & Yu, Q. 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual review of plant biology*, 61: 317-347.

Powell, H.A., Kerbby, N.W. & Rowell, P. 1991. Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. *New phytologist*, 119(3): 421-426.

Pratley, J.; Urwin, N.; Stanton, R.; Baines, P.; Broster, J.; Cullis, K.; Schafer, D.; Bohn, J. & Krueger, R. 1999. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. I. Bioevaluation. *Weed Science*, 47: 405-411

Price, A. & Kelton, J. 2011. Weed control in conservation agriculture. In *Herbicides, Theory and Applications*, Marcelo Larramendy (Ed.), ISBN: 978-953-307-975-2, InTech, Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/herbicides-theory-and-applications/weed-control-in-conservation-agriculture>>. Acesso: 08/09/2017.

Reddy, K.N., Rimando, A.M. & Duke, S.O. 2004. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(16): 5139-5143.

Rodrigues, L.B., Oliveira, R., Abe, F.R., Brito, L.B., Moura, D.S., Valadares, M.C., Grisolia, C.K., Oliveira, D.P. & Oliveira, G.A.R. 2017. Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(7): 1755-1763.

Rodriguez-Gil, J.L., Prosser, R., Poirier, D., Lissemore, L., Thompson, D., Hanson, M. & Solomon, K.R. 2017. Aquatic hazard assessment of MON 0818, a commercial mixture of alkylamine ethoxylates commonly used in glyphosate-containing herbicide formulations. Part 1: Species sensitivity distribution from laboratory acute exposures. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(2): 501-511.

Sáenz, M.E. & Di Marzio, W.D. 2009. Ecotoxicidad del herbicida glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. *Limnetica*, 28(1): 149-158.

Serra, A.A., Nuttens, A., Larvor, V., Renault, D., Couée, I., Sulmon, C. & Gouesbet, G. 2013. Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 64(10): 2753-2766.

Shieh, W.J., Geiger, D.R. & Serviates, J.C. 1991. Effect of N-(Phosphonomethyl) glycine on carbon assimilation and metabolism during a simulated natural day. *Plant Physiology*, 97(3): 1109-1114.

Sheath, R.G. & Burkholder, J. 1985. Characteristics of softwater stream in Rhode Island. II: Composition and seasonal dynamics of macroalgae communities. *Hydrobiologia* 128: 109-118.

Siqueira, S.C., Moreira, M.A., Mosquim, P.R., José, I.C., Ferreira, F.A. & Sediyaama, C.S. 1999. Simulação da soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por meio do cultivo de explantes. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11(1): 13-20.

Sobrero, M.C., Rimoldi, F. & Ronco, A.E. 2007. Effects of the glyphosate active ingredient and a formulation on *Lemna gibba* L. at different exposure levels and assessment end-points. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(5): 537-543.

Solomon, K.R. & Thompson, D.G. 2003. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 6: 289-324.

Stevenson, R.J., Bothwell, M.L. & Lowe, R.L. 1996. *Algal ecology-freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, 150-181.

Su, Y.S., Ozturk, L., Cakmak, I. & Budak, H. 2009. Turfgrass species response exposed to increasing rates of glyphosate application. *European Journal of Agronomy*, 31(3): 120-125.

Székács, A. & Darvas, B. 2012. Forty years with glyphosate. In *Herbicides-Properties, Synthesis and Control of Weeds*, Hasaneen, M.N. (Ed.), ISBN: 978-953-307-803-8, InTech, Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/herbicides-properties-synthesis-and-control-of-weeds/forty-years-withglyphosate>>. Acesso: 08/09/2017.

Takano, H.K., Junior, R.S.O., Constantin, J., Biffe, D.F.; Franchini, L.H.M.; Braz, G.B.P., Rios, F.A., Gheno, E.A. & Gemelli, A. 2013. Efeito da adição do 2, 4-D ao glyphosate para o controle de espécies de plantas daninhas de difícil controle. *Revista Brasileira de Herbicidas*, 12(1): 1-13.

Tsui, M.T. & Chu, L.M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7): 1189-1197.

United States Environmental Protection Agency. 2009. Drinking Water Contaminants. Disponível em: <<http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#List>>. Acesso: 25/03/2014.

Vaughn, K.C. & Duke, S.O. 1986. Ultrastructural effects of glyphosate on *Glycine max* seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 26: 56-65.

Veiga, F., Zapata, J.M., Marcos, M.F. & Alvarez, E. 2001. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Science of the Total Environment*, 271(1): 135-144.

Vencill, W., Grey, T. & Culpepper, S. 2011. Resistance of Weeds to Herbicides. In *Herbicides and Environment*, Andreas Kortekamp (Ed.), ISBN: 978-953-307-476-4, InTech, Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/resistance-of-weeds-to-herbicides>>. Acesso: 12/09/2017.

Vera, M.S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M.M., Juárez, A., Molina, M.C.R., Tell, G. & Pizarro, H. 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor on freshwater microbial communities.

Ecotoxicology, 21: 1805-1816.

Vera, M.S., Juárez, Á.B. & Pizarro, H.N. 2014. Comparative Effects of Technical-Grade and a Commercial Formulation of Glyphosate on the Pigment Content of Periphytic Algae. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 93(4): 399-404.

Vera, M.S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G.L., Rodriguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, C., Zagarese, H. & Pizarro, H. 2010. New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19: 710-719.

Vivancos, P.D., Driscoll, S.P., Bulman, C.A., Ying, L., Emami, K., Treumann, A., Mauve, C., Noctor, G. & Foyer, C.H. 2011. Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant physiology*, 157(1): 256-268.

Wagner, N., Reichenbecher, W., Teichmann, H., Tappeser, B. & Lötters, S. 2013. Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(8): 1688-1700.

Wang, N., Besser, J.M., Buckler, D.R., Honegger, J.L., Ingersoll, C.G., Johnson, B.T., Kurtzweil, M.L., MacGregor, J. & McKee, M.J. 2005. Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms. *Chemosphere*, 59(4): 545-551.

Woodburn, A.T. 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science*, 56: 309-312.

Yamada, T. & Castro, P.D.C. 2007. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. *Informações Agronômicas*, 119: 1-32.

Yannicari, M., Tambussi, E., Istilart, C. & Castro, A.M. 2012. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 210-217.

Zobiole, L.H.S., Kremer, R.J. & Constantin, J. 2012. Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175(2): 319-330.

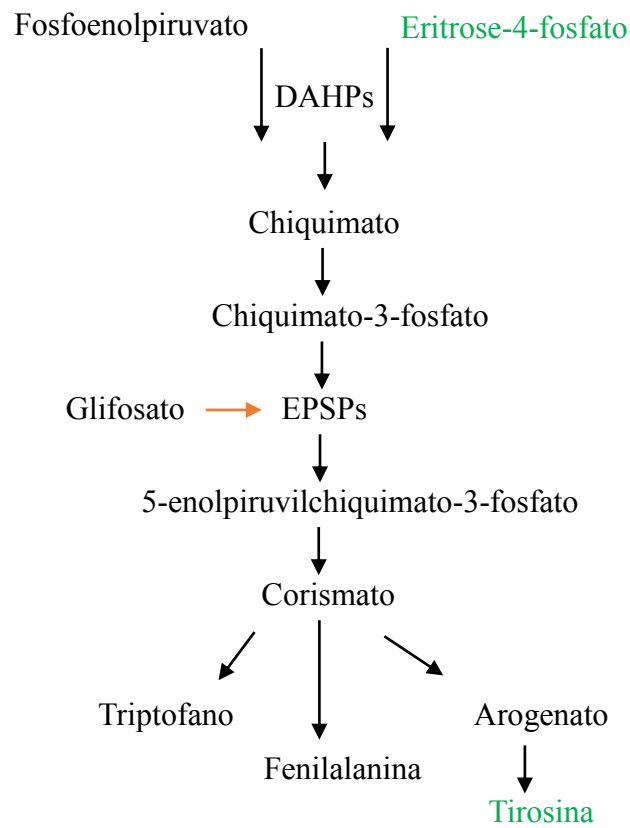
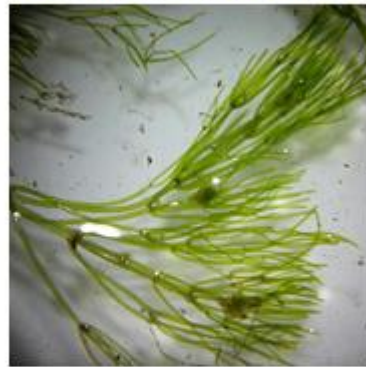


Figura 1. Representação do mecanismo de ação do glifosato. Em verde estão os compostos que, ao serem afetados pela interrupção do glifosato na via metabólica do chiquimato, geram efeitos na fotossíntese (ver Introdução Geral). Adaptado de Christoffoleti & López-Ovejero (2008).

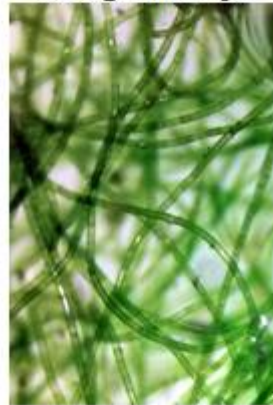
Nitella microcarpa var. *wrightii*
H. Groves & J. Groves



Spirogyra sp.



Oedogonium sp.



Desmidium grevillei
(Kützinger ex Ralfs) De Bary



Nitella subglomerata A. Braun



Figura 2. Macroalgas verdes de ambientes lóticos submetidas à herbicidas a base de glifosato utilizadas na avaliação das respostas fotossintéticas.

Capítulo 1

Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides and their degradation products on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae).

Régis de Campos Oliveira, Lucas Kortz Vilas Boas, and Ciro Cesar Zanini Branco

Laboratório de Biologia Aquática, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências e Letras,
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP,
Assis, SP, Brasil

Artigo publicado em 24 de junho de 2016 na revista *Phycologia*

Referência: Oliveira, R.C., Boas, L.K.V. & Branco, C.C.Z. 2016. Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae). *Phycologia*, 55(5): 577-584. <https://doi.org/10.2216/16-12.1>

Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae)

RÉGIS DE CAMPOS OLIVEIRA, LUCAS KORTZ VILAS BOAS AND CIRO CESAR ZANINI BRANCO*

Aquatic Biology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Sciences and Letters, São Paulo State University, UNESP, Assis, SP, Brazil

ABSTRACT: Although macroalgae are considered one of the most important primary producers in streams, to our knowledge there has been no research on the effects of herbicides on these organisms. Such studies are crucial for improving our understanding of the impact of these substances on stream ecology. In this study, we assess the effects of technical-grade glyphosate, Roundup and aminomethylphosphonic acid (AMPA; the main degradation product of glyphosate) on the photosynthetic rate, dark respiration rate and chlorophyll *a* content of *Nitella microcarpa* var. *wrightii*, a green algae found worldwide. Three concentrations of technical-grade glyphosate and Roundup were tested (0.28, 3.5 and 6 mg l⁻¹), while for AMPA only one concentration was evaluated (0.03 mg l⁻¹). Our results indicate that glyphosate has a stronger inhibitory effect on photosynthetic rate when applied in association with a surfactant (Roundup). These effects are related both to the concentration of the active ingredient and to exposure time. On the other hand, treatment with AMPA had a stimulatory effect on the photosynthetic rate, which may be associated with an increased supply of phosphorus available to the algae from the AMPA degradation process. From an ecological perspective, our results show that the ecological distribution of *N. microcarpa* var. *wrightii*, in terms of both spatial and temporal scales, can be affected by glyphosate-based herbicides in streams.

KEY WORDS: AMPA, Glyphosate, Green algae, Herbicides, Photosynthesis, Stream

INTRODUCTION

Herbicides containing glyphosate, *N*-(phosphonomethyl) glycine, are the most widely used herbicides in Brazil, with almost 188,000 tons sold in 2013 (IBAMA 2013). Absorbed by the plant through the leaves, glyphosate acts on aromatic amino acid synthesis by competitive inhibition of the enzyme EPSPs (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), blocking the metabolic synthesis of phenylalanine, tyrosine and tryptophan (Forlani *et al.* 2008). Some secondary effects have also been reported (Zobiolo *et al.* 2012; Serra *et al.* 2013; Gomes *et al.* 2014), such as the assimilation of Ca, Fe and Mn, which can be affected by the glyphosate complexation of these nutrients, inhibiting the translocation processes inside the plant (Senem Su *et al.* 2009; Zobiolo *et al.* 2012). The increased oxidative stress caused by the inhibition of aromatic amino acid synthesis has been observed with greater concentrations of ascorbate and inositol (Serra *et al.* 2013; Gomes *et al.* 2014). Glyphosate reduces the formation of microtubules, slowing down cell division, leading to nuclei with a lobed appearance and causing malformations in chloroplasts, which acquire a spiral shape, or disruptions of the chloroplast envelope (Campbell *et al.* 1976; Vaughn & Duke 1986).

The photosynthetic rate is affected by the drainage of carbon from the Calvin cycle for the synthesis of shikimate. After the inhibition of EPSP, arogenate, the allosteric inhibitor of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, stops being produced, resulting in the consumption

of erythrose-4-phosphate in this pathway and the inhibition of the regeneration of ribulose-1,5-bisphosphate in the Calvin cycle (Gomes *et al.* 2014). However, exactly how glyphosate inhibits chlorophyll synthesis is still not clear. Some studies have shown that the main degradation product of glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), is responsible for this effect, although the exact mechanism remains unknown (Reddy *et al.* 2004; Serra *et al.* 2013; Gomes *et al.* 2014).

Several studies from around the world have uncovered cases of glyphosate contamination in streams (Battaglin *et al.* 2005; Peruzzo *et al.* 2008). Samples from 51 streams belonging to nine Midwest states in the United States revealed the presence of glyphosate and AMPA in 36% and 69% of samples, respectively (Battaglin *et al.* 2005). Runoff analysis of natural rainfall uncovered extremely high concentrations of glyphosate (up to 5.2 mg l⁻¹; Edwards *et al.* 1980). Furthermore, high glyphosate concentrations have also been reported in streams from forests in the United States (1.24 mg l⁻¹; Newton *et al.* 1994) and the Argentinean pampas (0.7 mg l⁻¹; Peruzzo *et al.* 2008). In terms of AMPA concentrations in surface water, a review by Villeneuve *et al.* (2011) reported concentrations ranging from 0.04 to 66 µg l⁻¹ in Canada, 0.02 to 41 µg l⁻¹ in the United States and 2.1 to 48.1 µg l⁻¹ in France. In a more recent study involving streams located in agricultural regions of the United States, the average concentration of AMPA ranged from 0.14 to 26 µg l⁻¹ (Coupe *et al.* 2012).

The glyphosate concentration of water permitted by law varies depending on the country. In the United States, the limit of glyphosate permitted in drinking water is 0.7 mg l⁻¹ (US Environmental Protection Agency 2009); whereas, for the Council of the European Union (1998), the maximum

* Corresponding author (czbranco@assis.unesp.br).

DOI: 10.2216/16-12.1

© 2016 International Phycological Society

concentration allowed in drinking water is 0.0001 mg l^{-1} , and the maximum concentration of a pesticide mixture is 0.0005 mg l^{-1} . In Brazil, the limit for glyphosate established by Resolution No. 357/05 of the National Environmental Council (2005) for drinking water is 0.065 mg l^{-1} ; whereas, in water for irrigation and animal consumption, it is 0.28 mg l^{-1} .

In terms of freshwater benthic algae, studies investigating the physiological and/or ecological effects of glyphosate-based herbicides on these organisms have been conducted using only microbial communities (Tsui & Chu 2003; Pérez *et al.* 2007; Vera *et al.* 2010, 2012; Pizarro *et al.* 2016). Some have suggested that responses to glyphosate exposure are specific to the species involved and, more generally, among algal phyla (Vera *et al.* 2010, 2012). A reduction in cover due to glyphosate exposure was observed in diatoms (Vera *et al.* 2010); whereas, a significant increase in the growth of filamentous green algae and cyanobacteria was reported in a periphyton community (Vera *et al.* 2012). The green alga *Scenedesmus vacuolatus* Shihira & Krauss was also stimulated when subjected to low concentrations of glyphosate (Daouk *et al.* 2013). This increase in growth rate is probably related to an increase in the concentration of phosphorus generated by the herbicide degradation process (Forlani *et al.* 2008; Daouk *et al.* 2013).

To date, no studies have been published describing the possible effects of glyphosate-based or other herbicides on the macroscopic components of freshwater benthic algae referred to as macroalgae (Sheath & Cole 1992). However, considering the contamination risks reported elsewhere (Edwards *et al.* 1980; Newton *et al.* 1994; Villeneuve *et al.* 2011; Coupe *et al.* 2012) and the fact that macroalgae are considered one of the most important primary producers in streams and an ideal organism for monitoring water quality in lotic habitats (Branco *et al.* 2014), experimental studies evaluating the potential toxic effects of glyphosate-based herbicides on these organisms are vital to improve our understanding of the impact of these substances on stream systems.

Among stream macroalgae, those belonging to the green algal family Characeae play an important ecological role in aquatic ecosystems (Van Donk & Van de Bund 2002). Members of this family, which are considered among the closest relatives of terrestrial plants (Karol *et al.* 2001), have a strong influence on nutrient cycling and, as a consequence, on the richness and abundance of plankton (Van Donk & Van de Bund 2002). In addition, the group is considered an indicator of healthy and clear-water ecosystems (Krause 1981), and their ecological features make them particularly relevant in the management of water and wetlands (Van Nes *et al.* 2002).

Thus, our aim is to assess the effects of technical-grade glyphosate, AMPA, and a commercial glyphosate-based herbicide (Roundup) on the photosynthetic rate, dark respiration rate and chlorophyll *a* content of a tropical stream green macroalga. Considering the phylogenetic proximity of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* H. Groves & J. Groves to terrestrial plants, we hypothesised that macroalgae would be sensitive to glyphosate-based herbicides and AMPA, suffering an inhibition of photosynthetic rate and

chlorophyll *a* content and an increase in dark respiration rate after exposure to herbicides.

MATERIAL AND METHODS

Considering the relevance of charophycean green algae to aquatic ecosystems, the present study used *N. microcarpa* var. *wrightii* as a test organism. Samples containing specimens of *N. microcarpa* var. *wrightii* were collected in a stream in western São Paulo State ($22^{\circ}38'52''\text{S}$, and $50^{\circ}12'14''\text{W}$), southeastern Brazil. The stretch of the stream where the macroalgal samples were gathered is characterized by continuous rock substrate, low current velocity ($0.35 \pm 0.02 \text{ m s}^{-1}$, $\bar{X} \pm s$) and sunlight to the bottom of the stream (an 'opened stream', according to the classification by DeNicola *et al.* [1992]). After being collected, the specimens were placed in flasks with stream water and sent to the laboratory *in vivo*, where they were cleaned and weighed.

The cleaning process was performed using a stereoscopic microscope, paintbrush and pressurised distilled water sprays to remove all possible sediments and epiphytes. Each sample had an initial fresh weight of $150 \pm 10 \text{ mg}$. After cleaning and weighing, each specimen was transferred to an Erlenmeyer flask containing 100 ml of Bold's basal medium (without EDTA) (Watanabe 2005) and kept for 3 days in a BOD incubator (model 411/FDP355; Nova Ética, São Paulo, Brazil) at a constant temperature ($20 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) and irradiance ($140 \pm 15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and a 12:12 light:dark photoperiod. The irradiance was determined using a quantum meter (model LI-189; Li-Cor, Lincoln, Nebraska USA) connected to an LI-193 SA spherical quantum sensor.

After the 3-day acclimation, the specimens were transferred to Erlenmeyer flasks containing new Bold's basal medium with three different concentrations of technical-grade glyphosate ($\geq 95\%$ purity, CAS: 1071-83-6) and Roundup and one concentration of AMPA ($\geq 99\%$ purity, CAS: 1066-51-9). The treatment concentrations of technical-grade glyphosate and Roundup were chosen because they represent (1) the maximum concentration for irrigation and animal consumption allowed under Brazilian law (0.28 mg l^{-1}) (National Environmental Council 2005), (2) the recommended concentration to control plagues (3.5 mg l^{-1}) (Vera *et al.* 2012), and (3) the highest concentration found in a natural aquatic environment (6 mg l^{-1}) (Edwards *et al.* 1980). For AMPA, we used a treatment concentration of 0.03 mg l^{-1} , which is the median value reported for lotic environments (Villeneuve *et al.* 2011; Coupe *et al.* 2012).

The exposure concentrations for the Roundup treatment were calculated based on acid equivalent (a.e.) value (360 g l^{-1}). For these calculations, we added $0.77 \mu\text{l}$ of Roundup to 1 litre of Bold's basal medium to obtain an initial concentration of $0.28 \text{ mg a.e. l}^{-1}$, $9.7 \mu\text{l}$ to an initial concentration of $3.5 \text{ mg a.e. l}^{-1}$ and $16.6 \mu\text{l}$ to an initial concentration of 6 mg a.e. l^{-1} . For the technical-grade glyphosate and AMPA treatments, the concentrations tested were the nominal concentrations. Thus, to obtain, for instance, a technical-grade glyphosate initial concentration of 0.28 mg l^{-1} , we added 0.28 mg of this herbicide to 1 litre of Bold's basal medium. The same procedure was applied to all

the technical-grade glyphosate and AMPA treatments. Additionally, for all treatments, one control group (Bold's basal medium without herbicide) was simultaneously assessed.

The preparation of the exposure concentrations used in the toxicity tests for glyphosate-based herbicides and AMPA was carried out in accordance with the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines for the testing of chemicals 221 (OECD 2011). The exposure procedures described in these guidelines, although proposed for *Lemna* sp., also apply to *N. microcarpa* var. *wrightii*, as both are macroscopic freshwater primary producers. The test itself consists of a semistatic test with response analysis on the first (T1) and seventh day (T7) after herbicide exposure and with the renewal of the experimental media on the third and fifth day to avoid nutrient and active ingredient loss (Nešković *et al.* 1996; OECD 2011).

The effects of each treatment were evaluated by examining the response of the photosynthetic and dark respiration rates and the chlorophyll *a* content. Photosynthetic and dark respiration rates were measured by changes in oxygen concentrations using the light- and dark-bottle technique (Littler & Arnold 1985; Thomas 1988) and following the same procedures described by Vieira & Necchi (2003). This technique is considered one of the most efficient for analysing the effects of glyphosate-based herbicides on photosynthetic and dark respiration rates (Ralph 2000).

In the experiments involving the evaluation of photosynthetic rates, for each temporal analysis (i.e. T1 and T7), five replicates of the samples from each treatment condition (including the control) were transferred to 110-ml glass bottles with 98.5% transparency (light bottles) containing culture medium. The same incubation conditions were maintained during the experiments, with a constant temperature ($20 \pm 0.5^\circ\text{C}$), irradiance ($140 \pm 15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and agitation ($100 \pm 2.5 \text{ rpm}$) for a 1-hour period. For the evaluation of dark respiration rates (three replicates), we used the same procedures used for the assessment of photosynthetic rates, but the glass bottles were covered with aluminium foil (dark bottles) and incubated in complete darkness.

We measured the initial (before incubation period) and final (after incubation period) concentrations of dissolved oxygen in all the replicates from both the light and the dark bottles. These data were obtained on T1 and T7 using an oximeter (model 5100; YSI, Yellow Springs, Ohio USA), equipped with a self-stirring probe. The difference between the initial and final dissolved oxygen concentrations in the light and dark bottles was used to calculate the photosynthetic and dark respiration rates, using the formulas proposed by Littler & Arnold (1985).

After the oxygen concentration analysis, the macroalgal samples were dried at 70°C until they reached a constant weight, and their dry weight was measured using an analytical balance (AUW220D; Shimadzu, Kyoto, Japan). The chlorophyll *a* analysis was performed by applying a spectrophotometric technique using a 90% acetone solution as a solvent for extraction and a spectrophotometer (model SP220; Biospectro, Curitiba, Brazil) at wavelengths of 665

and 750 nm. We used a 90% acetone solution as a sample blank (Wetzel & Likens 2000).

The results of the technical-grade glyphosate and Roundup treatments were initially analysed using a Scott-Knott test (Scott & Knott 1974) in Sisvar (Ferreira 2000). The results of the AMPA treatment were analysed using an unpaired *t* test in Minitab v17 (Ryan *et al.* 1985). In addition, the effects of the treatments and exposure time on the photosynthetic rate, dark respiration rate and chlorophyll *a* content were assessed using a multivariate analysis of variance (MANOVA), performed in Minitab. In these analyses, photosynthetic rate, dark respiration rate and chlorophyll *a* content were dependent variables; whereas, the treatments and exposure time were covariates.

RESULTS

Photosynthetic rate

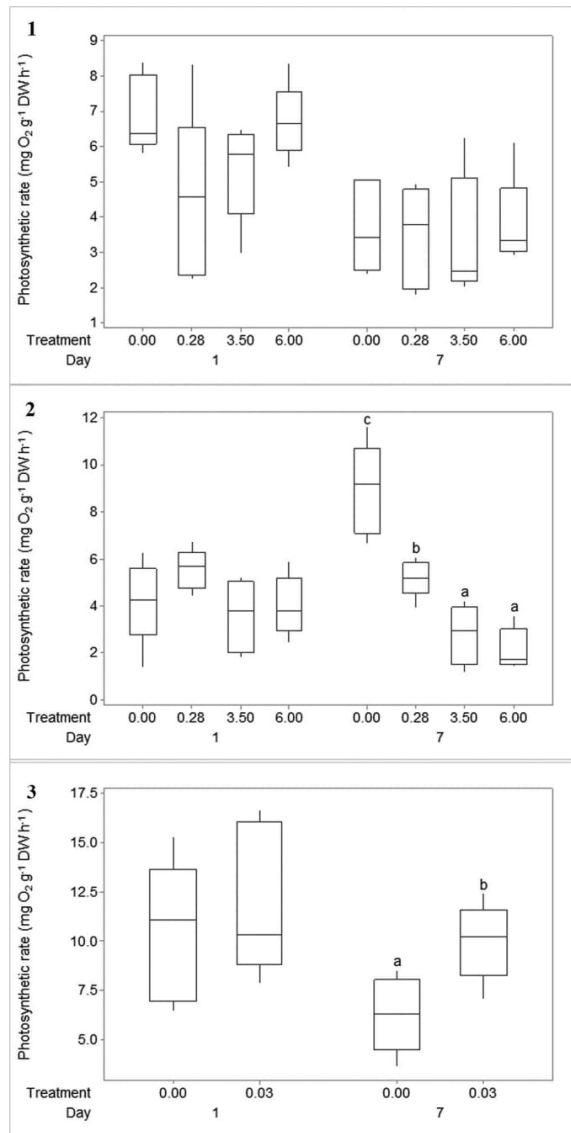
All the treatments with technical-grade glyphosate (-3% to -35.4% in relation to control) and Roundup (-4.3% to -14.3%), except the $0.28 \text{ mg a.e. l}^{-1}$ treatment concentration from Roundup ($+32.4\%$), showed a reduction in photosynthetic rate compared to the control group on T1 (Figs 1, 2). However, the results from the AMPA treatment indicated an increase in photosynthetic rate ($+14.8\%$) (Fig. 3). On T7, the technical-grade glyphosate treatments showed values similar to those seen in the control group, varying from slight inhibition, seen in the 0.28 and 3.5 mg l^{-1} treatments (-6.5% and -7.6% , respectively), to slight stimulation, seen in the 6 mg l^{-1} treatment ($+3\%$) (Fig. 1, Table 1).

No statistical differences were found between the technical-grade glyphosate, Roundup and AMPA treatments on T1. On T7, the photosynthetic rates for both Roundup ($F = 29.99$, $P < 0.001$) and AMPA ($t = 3.04$, $P < 0.01$) were significantly affected but in different ways (Figs 2, 3). For Roundup, all treatments showed a clear dose-dependent reduction in photosynthetic rates (Fig. 2). Thus, treatments of 0.28 , 3.5 and 6 mg a.e. l^{-1} reduced the photosynthetic rate to 42.1% , 69% and 76% of the control values, respectively. In addition, treatment with 0.03 mg l^{-1} AMPA resulted in a significant increase in photosynthetic rate when compared to controls ($+58.8\%$) (Fig. 3).

The MANOVA of the Roundup treatments showed that the interaction between treatment and exposure time significantly affected the photosynthetic rate ($F = 11.9$, $P < 0.01$) (Table 1). For the technical-grade glyphosate ($F = 8.1$, $P < 0.01$) and AMPA ($F = 4.98$, $P < 0.05$), only exposure time had a significant effect on photosynthetic rate (Table 1).

Dark respiration rate

The results on T1 showed a reduction in dark respiration rate in the technical-grade glyphosate treatments (-47.1% to -69.6% in relation to control) and in the $0.28 \text{ mg a.e. l}^{-1}$ treatment of Roundup (-14.4%) (Figs 4, 5). An increase in dark respiration rate was observed in the Roundup treatments with $3.5 \text{ mg a.e. l}^{-1}$ ($+17\%$) and 6 mg a.e. l^{-1} ($+46.5\%$) and in the AMPA treatment ($+21.2\%$) (Figs 5, 6, Table 1). On T7, all



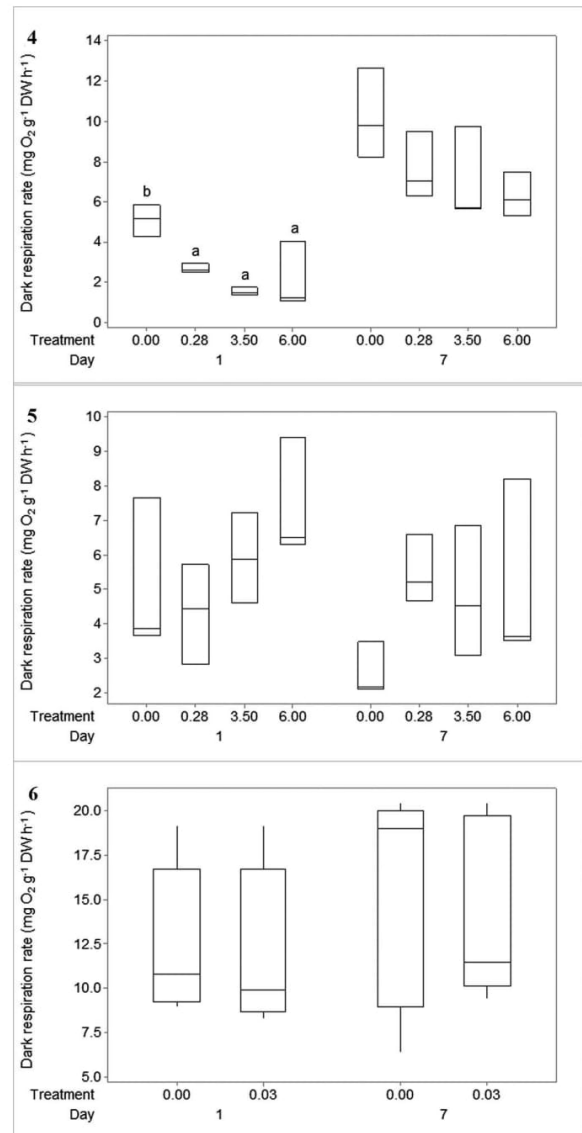
Figs 1–3. Photosynthetic rate ($n = 5$) for *Nitella microcarpa* var. *wrightii* for each treatment on days of exposure. Different letters represent significant statistical differences ($P < 0.05$). Horizontal lines depict medians, boxes represent interquartiles and vertical lines represent the range.

Fig. 1. Technical-grade glyphosate.

Fig. 2. Roundup.

Fig. 3. AMPA.

the technical-grade glyphosate treatment concentrations (reduction varying from -25.4% to -38.4% in relation to the control) and the AMPA treatment (-37.1%) showed a decrease in dark respiration rate. In the Roundup treatments, stimulation of the dark respiration rates was observed, with the gains varying from $+86.1\%$ to $+111.8\%$ relative to the control.



Figs 4–6. Dark respiration rate ($n = 3$) for *Nitella microcarpa* var. *wrightii* for each treatment on days of exposure. Different letters represent significant statistical differences ($P < 0.05$). Horizontal lines depict medians, boxes represent interquartiles and vertical lines represent the range.

Fig. 4. Technical-grade glyphosate.

Fig. 5. Roundup.

Fig. 6. AMPA.

A statistical difference was found only for technical-grade glyphosate on T1 ($F = 10.49$, $P < 0.01$), with the control showing higher values than all the treatments (Fig. 4, Table 2).

The MANOVA results showed that exposure time ($F = 28.4$, $P < 0.01$) had a significant impact on the variation in the *N. microcarpa* var. *wrightii* dark respiration rates in the technical-grade glyphosate treatments (Table 2). The MAN-

Table 1. MANOVA using the Wilks lambda test, with photosynthetic rate for *Nitella microcarpa* var. *wrightii* as the dependent variable and exposure time and treatment as covariates. Statistically significant differences at $P < 0.05$ were considered.

	Glyphosate			Roundup			AMPA		
	Wilks	F	P	Wilks	F	P	Wilks	F	P
Time	0.81	8.1	< 0.01	0.79	9.06	< 0.01	0.76	4.98	< 0.05
Treatment	0.98	0.61	0.43	0.99	0.07	0.79	0.98	0.29	0.59
Time $\times$ treatment	0.99	0.2	0.65	0.75	11.9	< 0.01	0.95	0.66	0.42

OVA showed no significant results for Roundup and AMPA (Table 2).

Chlorophyll *a* content

On T1, the chlorophyll *a* content decreased in the 0.28 mg l⁻¹ (-2.6% in relation to control) and 6 mg l⁻¹ (-4.5%) technical-grade glyphosate treatments and the 0.03 mg l⁻¹ AMPA treatment (-15%); whereas, for the 3.5 mg l⁻¹ (+3.3%) technical-grade glyphosate treatment and all the Roundup treatments (+32.3% to +70.5%), we observed an increase in this parameter (Figs 7–9, Table 3). On T7, the AMPA treatment showed lower values of chlorophyll *a* (-1.4%) in comparison to the control group; whereas, the technical-grade glyphosate (+20.5% to +49.2%) and all Roundup treatments (+78.74% to +125.41%) showed higher values than the control group.

Differences in chlorophyll *a* content were significant in the Roundup treatments only on T7 ($F = 7.32$, $P < 0.01$) (Fig. 8, Table 3).

The MANOVA showed that exposure time to technical-grade glyphosate ($F = 5.59$, $P < 0.05$), Roundup ($F = 5.72$, $P < 0.05$) and AMPA ($F = 40.4$, $P < 0.01$) had a significant effect on chlorophyll *a* content (Table 3).

DISCUSSION

Despite the fact that most of the Roundup treatments showed a reduction in photosynthetic rates of *N. microcarpa* var. *wrightii*, a statistically significant difference was observed only after 7 days of exposure, indicating that the amount of time that the organism remained in contact with this herbicide was crucial for determining its negative effects on macroalgal productivity. This long-term effect has also been observed in other studies related to the periphyton community (Vera *et al.* 2012). Additionally, the MANOVA showed that the inhibition of *N. microcarpa* var. *wrightii* photosynthetic rates was affected by an interaction between the concentration of Roundup and

exposure time to the herbicide ($F = 11.9$, $P < 0.01$) (Table 1), with photosynthesis declining only when concentration and exposure time increased. From an ecological perspective, the reduction in productivity in this primary producer may have a negative impact not only on abundance but also on other primary producers that use the macroalgae as a substrate and on the many herbivores that feed from them (Hua & Relyea 2014). A negative impact on biomass/abundance through indirect trophic cascade effects has been reported for other aquatic organisms and systems (Baker *et al.* 2014).

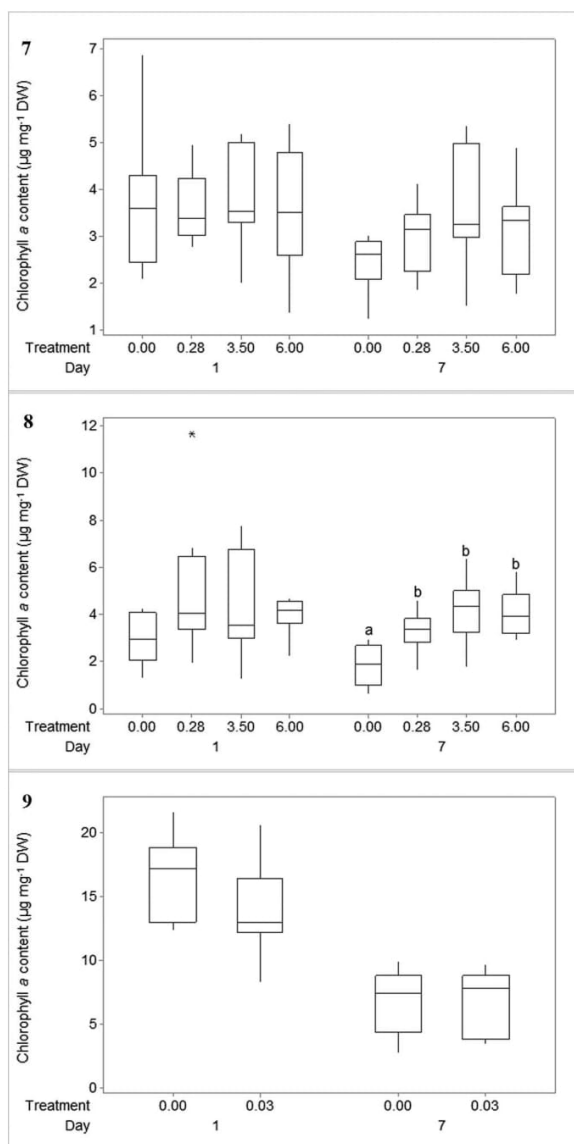
One of the most dramatic findings of this study is that a significant reduction in photosynthetic rate of *N. microcarpa* var. *wrightii* was observed (-42.1%) even at the lowest Roundup concentration tested (0.28 mg l⁻¹). Considering that 0.28 mg l⁻¹ is the maximum concentration of this herbicide allowed by Brazilian law in water used for irrigation and animal consumption (National Environmental Council 2005) and the occurrence of glyphosate in the environment (Coupe *et al.* 2012; Majewski *et al.* 2014), this result suggests that even legal concentrations of Roundup in water bodies commonly used for these activities (e.g. low-order streams and small lakes) may present significant environmental risks.

The significant impact of exposure time on the inhibition of photosynthetic rates and chlorophyll *a* content observed in the MANOVA analyses for technical-grade glyphosate and AMPA were related not to the presence of these herbicides but rather to the normal decay of these parameters over time.

No significant differences were found between the control group and the tested concentrations of technical-grade glyphosate on either T1 or T7. Tsui & Chu (2003) pointed out that the combined effects of both the active ingredient and the surfactant present in its formulation [polyoxyethylene amine – (POEA)] causes the toxicity of Roundup and that, depending on the organism considered, POEA could be more toxic than technical-grade glyphosate. Our results confirm this suggestion by Tsui & Chu (2003) in *N. microcarpa* var. *wrightii*, as the significant negative effect on

Table 2. MANOVA using the Wilks lambda test, with dark respiration rate for *Nitella microcarpa* var. *wrightii* as the dependent variable and exposure time and treatment as covariates. Statistically significant differences at $P < 0.05$ were considered.

	Glyphosate			Roundup			AMPA		
	Wilks	F	P	Wilks	F	P	Wilks	F	P
Time	0.41	28.4	< 0.01	0.98	0.34	0.56	0.95	0.79	0.38
Treatment	0.89	2.29	0.14	0.83	3.95	0.06	0.99	0.005	0.94
Time $\times$ treatment	0.99	0.15	0.7	0.96	0.65	0.42	0.99	0.02	0.87



Figs 7–9. Chlorophyll *a* content ($n = 8$) for *Nitella microcarpa* var. *wrightii* for each treatment (0, 0.03, 0.28, 3.5 and 6 mg l^{-1}) on T1 and T7 days of exposure. Different letters represent significant statistical differences ($P < 0.05$). Vertical lines depict medians, boxes represent interquartiles and horizontal lines represent the range.

Fig. 7. Technical-grade glyphosate.

Fig. 8. Roundup.

Fig. 9. AMPA.

photosynthetic rates produced by Roundup on T7 was not observed for technical-grade glyphosate. In addition, the MANOVA revealed that an increase in technical-grade glyphosate concentration causes a decrease in dark respiration rates, indicating a hormesis response in *N. microcarpa* var. *wrightii* (Cedergreen *et al.* 2007).

The AMPA treatment showed a clear tendency towards increasing *N. microcarpa* var. *wrightii* photosynthetic rates on T7. The increase in photosynthetic rates is probably related to AMPA degradation by photolysis and hydrolysis, during which phosphorous is produced (Giesy *et al.* 2000). In addition, our results from the AMPA treatment suggest that, despite the fact that *N. microcarpa* var. *wrightii* can be adversely affected immediately after contact with herbicides (as shown by the negative effects on photosynthetic rates produced by technical-grade glyphosate and Roundup), the productivity of this algae can be stimulated over time (Coupe *et al.* 2012). This stimulation is probably due to the stoichiometric degradation of glyphosate, which results in an increase in AMPA and phosphorus in the water (Vera *et al.* 2012; Daouk *et al.* 2013). Thus, given the fluctuation in the productivity of *N. microcarpa* var. *wrightii* caused by these herbicides, we recommend that future ecological studies on the spatial and temporal distribution of this species of green algae take into account the concentration of glyphosate and AMPA in the water, alongside the other traditionally used parameters, when investigating the ecology of stream macroalgae (e.g. water temperature, pH, dissolved oxygen and nutrients, among others).

In terms of chlorophyll *a* content, the reduction observed in the control group relative to the Roundup treatments on T7, exactly when the highest photosynthetic rate was reported, suggests the occurrence of a physiological reallocation of resources. As such, part of the chlorophyll *a* content of *N. microcarpa* var. *wrightii* was likely degraded to generate additional nitrogen to sustain the increase in the photosynthetic rate. This strategy has been documented in several other producers, including phytoplanktonic algae (Adams & Bugbee 2014).

In the present study, glyphosate-based herbicides showed different effects on the photosynthetic parameters of *N. microcarpa* var. *wrightii*, suggesting that the form that these herbicides take in the environment (only active ingredient, i.e. technical-grade glyphosate; active ingredient + surfactant, i.e. Roundup; or the degraded form, i.e. AMPA) can be crucial in determining the intensity of the effect on the productivity of aquatic primary producers. These effects suggest that the productivity of aquatic primary producers could show relevant fluctuations based on the agricultural land use of the region in which the aquatic ecosystem is

Table 3. MANOVA using the Wilks lambda test, with chlorophyll *a* content for *Nitella microcarpa* var. *wrightii* as the dependent variable and exposure time and treatment as covariates. Statistically significant differences at $P < 0.05$ were considered.

	Glyphosate			Roundup			AMPA		
	Wilks	<i>F</i>	<i>P</i>	Wilks	<i>F</i>	<i>P</i>	Wilks	<i>F</i>	<i>P</i>
Time	0.91	5.59	< 0.05	0.91	5.72	< 0.05	0.4	40.4	< 0.01
Treatment	0.99	0.11	0.73	0.99	0.06	0.79	0.91	2.58	0.11
Time $\times$ treatment	0.97	1.25	0.26	0.95	2.74	0.1	0.95	1.23	0.27

located. Consequently, the presence of glyphosate-based herbicides in water must be considered in ecological studies of stream macroalgae, especially when analyzing spatial and temporal distribution.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank FAPESP (proc. 2014/22952-6) for financial support, the CNPq for providing RCO with a doctoral scholarship (proc. 140070/2014-1) and CCZB with a research grant (proc. 306567/2014-8) and CAPES for providing a master scholarship for LKVB.

REFERENCES

- ADAMS C. & BUGBEE B. 2014. Nitrogen retention and partitioning at the initiation of lipid accumulation in nitrogen-deficient algae. *Journal of Phycology* 50: 356–365.
- BAKER L.F., MUDGE J.F., HOULAHAN J.E., THOMPSON D.G. & KIDD K.A. 2014. The direct and indirect effects of a glyphosate-based herbicide and nutrients on Chironomidae (Diptera) emerging from small wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 2076–2085.
- BATTAGLIN W.A., KOLPIN D.W., SCRIBNER E.A., KUIVILA K.M. & SANDSTROM M.W. 2005. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams, 2002. *Journal of American Water Resources Association* 41: 323–332.
- BRANCO C.C.Z., BISPO P.C., PERES C.K., TONETTO A.F. & BRANCO L.H. 2014. The roles of environmental conditions and spatial factors in controlling stream macroalgal communities. *Hydrobiologia* 732: 123–132.
- CAMPBELL W.F., EVANS J.O. & REED S.C. 1976. Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. *Weed Science* 24: 22–25.
- CEDERGREEN N., STREIBIG J.C., KUDSK P., MATHIASSEN S.K. & DUKE S.O. 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-Response* 5: 150–162.
- COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. 1998. Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities* 330: 32–54.
- COUPE R.H., KALKHOFF S.J., CAPEL P.D. & GREGOIRE C. 2012. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Management Science* 68: 16–30.
- DAOUK S., COPIN P.J., ROSSI L., CHÈVRE N. & PFEIFER H.R. 2013. Dynamics and environmental risk assessment of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in a small vineyard river of the Lake Geneva catchment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 2035–2044.
- DE NICOLA D.M., HOGLAND K.D. & ROEMER S.C. 1992. Influence of canopy cover on spectral irradiance and periphyton assemblages in a prairie stream. *Journal of the North American Benthological Society* 11: 391–404.
- EDWARDS W.M., TRIPLETT G.B. & KRAMER R.M. 1980. A watershed study of glyphosate transport in runoff. *Journal Environmental Quality* 9: 661–665.
- FERREIRA D.F. 2000. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: *45a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria*, pp. 255–258. UFSCAR, São Carlos, Brazil.
- FORLANI G., PAVAN M., GRAMEK M., KAFARSKI P. & LIPOK J. 2008. Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. *Plant and Cell Physiology* 49: 443–456.
- GIESY J.P., DOBSON S. & SOLOMON K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167: 35–120.
- GOMES M.P., SMEDBOL E., CHALIFOUR A., HÉNAULT-ETHIER L., LABRECQUE M., LEPAGE L., LUCOTTE M. & JUNEAU P. 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany* 65: 4691–4703.
- HUA J. & RELYEA R.A. 2014. Chemical cocktails in aquatic systems: pesticide effects on the response and recovery of > 20 animal taxa. *Environmental Pollution* 189: 18–26.
- IBAMA 2013. Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos – Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>; searched on 13 May 2015.
- KAROL K.G., MCCOURT R.M., CIMINO M.T. & DELWICHE C.F. 2001. The closest living relatives of land plants. *Science* 294: 2351–2353.
- KRAUSE W. 1981. Characeen als bioindikatoren für den gewässerzustand. *Limnologica* 13: 339–418.
- LITTLER M.M. & ARNOLD K.E. 1985. Electrodes and chemicals. In: *Handbook of phycological methods. Ecological field methods: Macroalgae* (Ed. by M.M. Little & D.S. Little), pp. 349–375. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- MAJEWSKI M.S., COUPE R.H., FOREMAN W.T. & CAPEL P.D. 2014. Pesticides in Mississippi air and rain: a comparison between 1995 and 2007. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1283–1293.
- NATIONAL ENVIRONMENTAL COUNCIL. 2005. Resolução no 357 de 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União* 53: 58–66.
- NEŠKOVIĆ N.K., POLEŠIĆ V., ELEZOVIĆ I., KARAN V. & BUDIMIR M. 1996. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 295–302.
- NEWTON M., HORNER L.H., COWELL J.E., WHITE D.E. & COLE E.C. 1994. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American forests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1795–1802.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. 2011. *Lemma sp. growth inhibition test*. Guideline 221. OECD, Paris.
- PÉREZ G.L., TORREMORELL A., MUGNI H., RODRIGUEZ P., VERA M.S., NASCIMENTO M., ALLENDE L., BUSTINGORRY J., ESCARAY R., FERRARO M., IZAGUIRRE I., PIZARRO H., BONETTO C. & MORRIS D.P. 2007. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications* 17: 2310–2322.
- PERUZZO P.J., PORTA A.A. & RONCO A.E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156: 61–66.
- PIZARRO H., VERA M.S., VINOCUR A., PÉREZ G., FERRARO M., HELMAN R.M. & DOS SANTOS AFONSO M. 2016. Glyphosate input modifies microbial community structure in clear and turbid freshwater systems. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 5143–5153.
- RALPH P.J. 2000. Herbicide toxicity of *Halophila ovalis* assessed by chlorophyll a fluorescence. *Aquatic Botany* 66: 141–152.
- REDDY K.N., RIMANDO A.M. & DUKE S.O. 2004. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5139–5143.
- RYAN B.F., JOINER B.L. & RYAN T.A. 1985. *Minitab handbook*. Duxbury Press, Boston.
- SCOTT A.J. & KNOTT M.A. 1974. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30: 507–512.
- SENEB SU Y., OZTURK L., CAKMAK I. & BUDAK H. 2009. Turfgrass species response exposed to increasing rates of glyphosate application. *European Journal of Agronomy* 31: 120–125.
- SERRA A.A., NUTTENS A., LARVOR V., RENAULT D., COUÉE I., SULMON C. & GOUESBET G. 2013. Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 64: 2753–2766.

- SHEATH R.G. & COLE K.M. 1992. Biogeography of stream macroalgae in North America. *Journal of Phycology* 28: 448–460.
- THOMAS M.L.H. 1988. Photosynthesis and respiration of aquatic macro-flora using the light and dark bottle oxygen method and dissolved oxygen analyser. In: *Experimental phycology: A laboratory manual* (Ed. by C.S. Lobban, D.J. Chapman & B.P. Kremer), pp. 64–77. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- TSUI M.T. & CHU L.M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52: 1189–1197.
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2009. Drinking water contaminants. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#List>; searched on 13 May 2015.
- VAN DONK E. & VAN DE BUND W.J. 2002. Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms. *Aquatic Botany* 72: 261–274.
- VAN NES E.H., SCHEFFER M., VAN DEN BERG M.S. & COOPS H. 2002. Dominance of charophytes in eutrophic shallow lakes – when should we expect it to be an alternative stable state? *Aquatic Botany* 72: 275–296.
- VAUGHN K.C. & DUKE S.O. 1986. Ultrastructural effects of glyphosate on *Glycine max* seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 26: 56–65.
- VERA M.S., LAGOMARSINO L., SYLVESTER M., PÉREZ G.L., RODRÍGUEZ P., MUGNI H., SINISTRO R., FERRARO M., BONETTO C., ZAGARESE H. & PIZARRO H. 2010. New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19: 710–721.
- VERA M.S., DI FIORI E., LAGOMARSINO L., SINISTRO R., ESCARAY R., IUMMATO M.M., JUÁREZ A., MOLINA M.C.R., TELL G. & PIZARRO H. 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology* 21: 1805–1816.
- VIEIRA J.J.R. & NECCHI O.J.R. 2003. Photosynthetic characteristic of charophytes from tropical ecosystems. *Phycological Research* 51: 51–60.
- VILLENEUVE A., LARROUDÉ S. & HUMBERT J.F. 2011. Herbicide contamination of freshwater ecosystems: Impact on microbial communities. In: *Pesticides: Formulations, effects, fate* (Ed. by M. Stoytcheva), pp. 285–312. InTech Open Access, Rijeka, Croatia.
- WATANABE M.M. 2005. Freshwater culture media. In: *Algal culture techniques* (Ed. by R.A. Andersen), pp. 13–20. Elsevier, New York.
- WETZEL R.G. & LIKENS G.E. 2000. *Limnological analyses*. Springer, New York. 429 pp.
- ZOBIOLE L.H.S., KREMER R.J., DE OLIVEIRA R.S. & CONSTANTIN J. 2012. Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175: 319–330.

Received 26 January 2016; accepted 20 April 2016
Associate Editor: John Beardall

Capítulo 2

Efeito de herbicidas a base de glifosato, e seu produto de degradação, sobre as respostas fotossintéticas de macroalgas verdes em ambientes lóticos tropicais.

Régis de Campos Oliveira & Ciro Cesar Zanini Branco

Laboratório de Biologia Aquática, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências e Letras,
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP,
Assis, SP, Brasil

Artigo em preparação para submissão na revista *Chemosphere*.

Resumo

Em meio ao crescente uso de herbicidas a base de glifosato, a suscetibilidade dos ambientes aquáticos aos eventos de contaminação tornam-se preocupantes, principalmente quando estes herbicidas afetam processos fisiológicos importantes como a fotossíntese, que acaba por prejudicar não apenas os produtores primários, mas também toda a cadeia trófica desses ecossistemas. Considerando os eventos de contaminação de herbicidas a base de glifosato e a importância estrutural e funcional das macroalgas verdes para os ambientes lóticos tropicais de baixas e médias ordens, este trabalho avaliou as respostas fotossintéticas de quatro macroalgas verdes (*Nitella subglomerata*, *Oedogonium* sp., *Spirogyra* sp., e *Desmidiium grevillei*), através do método de evolução do oxigênio dissolvido (frascos claros e escuros), da fluorescência da clorofila *a* e da concentração de clorofila *a*, quando expostas a herbicidas a base de glifosato. Foram utilizadas três concentrações (0,28, 3,5 e 6 mg L⁻¹) para o glifosato (grau técnico) e Roundup®, e uma (0,03 mg L⁻¹) para o seu principal produto de degradação (AMPA). As respostas fotossintéticas da macroalgas investigadas foram analisadas após um e sete dias de exposição. Os resultados mostraram que as respostas foram táxon-específicas, portanto, variáveis entre as macroalgas analisadas. Porém, em regra, o Roundup® foi o herbicida que mais afetou negativamente as respostas fotossintéticas das macroalgas testadas, gerando danos ao aparato fotossintético, provocando reduções na taxa de fotossíntese líquida, e na concentração de clorofila *a*. O glifosato grau técnico e o AMPA também causaram efeitos inibitórios significativos para a resposta fotossintética, ainda que em uma escala menor quando comparado ao Roundup®. Destaca-se que dentre as macroalgas analisadas, *Spirogyra* sp. foi aquela que tendeu a ser a mais prejudicada frente a eventos de contaminação da água por glifosato. A partir destes resultados, é possível inferir que a presença de herbicidas a base de glifosato na água de riachos tropicais de baixas e médias ordens pode produzir alterações na composição e/ou na estrutura das comunidades destes produtores primários, e, por consequência do efeito cascata, afetar a dinâmica estrutural e funcional destes ecossistemas.

Palavras-chave: glifosato, AMPA, Roundup®, fotossíntese, macroalgas verdes.

Introdução

A alta demanda por alimento, juntamente com os avanços nas pesquisas em transgenia, fez do glifosato, N-(fosfonometil) glicina, um dos herbicidas mais utilizados no mundo (Annett *et al.*, 2014; Battaglin *et al.*, 2014; Poiger *et al.*, 2017). Paralelamente, a preocupação com os eventos de contaminação do glifosato também tem crescido, uma vez que, condições ambientais adversas para o manejo (p.ex., chuvas e rajadas de vento no momento ou logo após à aplicação) podem levar este herbicida para os ambientes aquáticos adjacentes a áreas agrícolas, reduzindo o número de espécies e influenciando nos padrões de fluxo de energia e na ciclagem de nutrientes desses ecossistemas (Pérez *et al.*, 2011; Battaglin *et al.*, 2014; Magbanua *et al.*, 2016).

Este problema mostra-se ainda mais sério ao se considerar o uso doméstico em gramados e jardins de herbicidas à base de glifosato (Hanke *et al.*, 2010; Annet *et al.*, 2014). Um estudo recente com riachos inseridos em áreas urbanas e agrícolas da região meio oeste dos EUA mostrou que o glifosato tem sido encontrado com frequência em ambientes aquáticos localizados em áreas urbanas, apresentando, inclusive, concentrações semelhantes aos reportados para os riachos em áreas agrícolas (Mahler *et al.*, 2017). De fato, existe uma série de estudos que detectaram, em ambientes aquáticos, a presença do glifosato, em maior ou menor concentração, nos EUA (1,24 mg L⁻¹ - Newton *et al.*, 1994; 0,07 mg L⁻¹ - Battaglin *et al.*, 2014); no Canadá (2,8 mg L⁻¹ - Legris & Couture, 1989; 1,1 e 1,5 mg L⁻¹ - Feng *et al.*, 1990; 1,54 mg L⁻¹ - Couture *et al.*, 1995); na Argentina (0,7 mg L⁻¹ - Peruzzo *et al.*, 2008); e no Brasil (0,1 mg L⁻¹ - Silva *et al.*, 2003). No caso mais grave, um estudo desenvolvido nos EUA reportou a concentração de 5,2 mg L⁻¹ de glifosato em águas de escoamento da chuva após um dia de aplicação no campo (Edwards *et al.*, 1980).

Em relação ao principal produto de degradação do glifosato, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), as concentrações encontradas em águas superficiais variam pronunciadamente. Em um levantamento bibliográfico feito por Villeneuve *et al.* (2011) os autores reportaram uma variação de 0,00004 a 0,066 mg L⁻¹ para coletas realizadas no Canadá; 0,00002 a 0,041 mg L⁻¹ nos EUA e de 0,0021 a 0,0481 mg L⁻¹ na França. Outros estudos também, reportaram uma ampla variação da concentração de AMPA em águas superficiais, tais como: Coupe *et al.*, 2012 - entre 0,00007 e 0,43 mg L⁻¹; Battaglin *et al.*, 2014 - entre 0,002 e 0,028 mg L⁻¹ e Poiger *et al.*, 2017 - entre 0,0021 e 0,0026 mg L⁻¹.

Do ponto de vista da legislação ambiental no Brasil, percebe-se que não existe um consenso entre as agências regulatórias sobre a concentração máxima de glifosato permitida na água. O limite de concentração de glifosato, estabelecido pela resolução nº357/05 do Conselho

Nacional do Meio Ambiente, para as categorias de água doce de classes I e II (destinadas ao consumo humano) corresponde a $0,065 \text{ mg L}^{-1}$ e para água doce de classe III (destinada a irrigação e ao consumo animal) a $0,28 \text{ mg L}^{-1}$ (CONAMA, 2005). Por sua vez, o Ministério da Saúde, na portaria nº 2914 publicada em 2011, estabelece que para o padrão de potabilidade da água o valor máximo permitido é de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato e AMPA, em conjunto (Ministério da Saúde (BR), 2011).

O principal mecanismo de ação do glifosato consiste na inibição competitiva da enzima EPSPs (5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase) que integra a via metabólica responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos (Devine *et al.*, 1993; Forlani *et al.*, 2008; Sáenz & Di Marzio, 2009). A interrupção na atividade da enzima EPSPs provocada pelo glifosato gera também efeitos indiretos na fotossíntese através da redução na concentração de carotenoides, clorofila *a* e ácidos graxos (Yamada & Castro, 2007; Zobiole *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2014; 2017). Outros efeitos do glifosato na fotossíntese residem no dreno de carbono do ciclo de Calvin, através do consumo constante de eritrose-4-fosfato na via metabólica dos aminoácidos aromáticos (Geiger *et al.*, 1986; 1987; Shieh *et al.*, 1991; Yamada & Castro, 2007), e na redução da produção de proteínas que compõe estruturalmente os centros de reação do fotossistema II (PSII) (Vivancos *et al.*, 2011; Yanniccari *et al.*, 2012). Adicionalmente, estudos que abordam os efeitos fisiológicos do AMPA, ainda que escassos, têm demonstrado que este herbicida pode inibir a produção de clorofila *a* agindo de modo distinto em relação ao glifosato, uma vez que este composto proporciona a degradação do pigmento pela produção de espécies reativas de oxigênio (Reddy *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2014; 2016).

As consequências dos efeitos fisiológicos do glifosato descritos acima tendem a impactar as comunidades de produtores primários em ambiente aquáticos, como apontam estudos que atestaram, por exemplo, mudanças na composição das comunidades perifíticas e fitoplanctônicas (Boutin *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2014; Pizarro *et al.*, 2016).

As macroalgas verdes, que comumente formam as comunidades mais diversas, principalmente em ambientes com alta irradiância (Necchi, 2004; Oliveira *et al.*, 2013; Peres *et al.*, 2017), representam uma parcela importante de produtores primários em ambientes lóticos, por fornecerem alimento e habitat para invertebrados aquáticos (Sheath & Burkholder 1985, Stevenson, 1996; Okada & Watanabe, 2002). Além de sua importância ecológica, as macroalgas verdes têm o potencial uso na biorremediação em estações de tratamento de esgoto e na produção de biocombustíveis (Ge *et al.*, 2017). Ainda que as macroalgas verdes sejam tão importantes ecologicamente, estudos sobre o efeito de herbicidas a base de glifosato nesses organismos são escassos. Em um estudo recentemente desenvolvido com a espécie *Nitella*

microcarpa var. *wrightii* H. Groves & J. Groves mostrou-se que o tempo de exposição e a forma como o glifosato se encontra no ambiente (puro, combinado com o surfactante, ou degradado em AMPA) podem afetar significativamente a produtividade dessa macroalga (Oliveira *et al.*, 2016).

Assim, considerando a possibilidade concreta de que herbicidas a base de glifosato possam afetar significativamente as macroalgas verdes lóticais tropicais, este trabalho foi conduzido como o objetivo de avaliar os efeitos do glifosato grau técnico, da formulação comercial (Roundup®) e do seu principal produto de degradação (AMPA) sobre a resposta fotossintética de espécies de macroalgas verdes que ocorrem, tipicamente, em ambientes lóticos tropicais de baixas ordens. A partir dos resultados observados para a espécie *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Oliveira *et al.*, 2016), espera-se que: i) a magnitude dos efeitos inibitórios gerados pelos herbicidas seja proporcional ao aumento da concentração testada; ii) e que o Roundup® cause mais efeitos negativos para a resposta fotossintética das macroalgas analisadas em relação ao glifosato grau técnico e ao AMPA.

Material e Métodos

Os espécimes de macroalgas coletados em riachos de baixas ordens (2ª e 3ª ordens) (Tabela 1) foram encaminhadas *in vivo* para o laboratório onde foram realizadas a limpeza, com auxílio de microscópio estereoscópico e pincel de cerdas duras e jatos de água destilada, e a pesagem das amostras com peso fresco de 150 ± 10 mg.

Após a pesagem, realizada com balança analítica (Shimadzu, AUW220D), as amostras macroalgais foram transferidas para erlenmeyers contendo 100 mL de meio básico de Bold (Watanabe, 2005), sem EDTA, para os tratamentos com glifosato grau técnico e AMPA. A exclusão do EDTA do meio se deu para evitar que este composto atuasse como um surfactante, facilitando a entrada do herbicida através da membrana plasmática, e consequentemente, superestimando os resultados deste grupo experimental (Shea & Tupy, 1984).

As amostras foram mantidas aclimatadas por três dias em estufas tipo B.O.D. (marca Nova Ética, modelo 411/FDP355), com fotoperíodo de 12/12 horas e nas mesmas condições de temperatura ($20 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e irradiância ($140 \pm 15 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) que foram utilizadas no experimento.

A fim de avaliar a influência da concentração dos herbicidas testados, foram utilizadas três concentrações diferentes nos testes envolvendo glifosato grau técnico (pureza ≥ 95 %; CAS: 1071-83-6) e Roundup®, a saber: i) 0,28 mg de ingrediente ativo [i.a.]L⁻¹ - representando a concentração máxima para águas de classe III, segundo a resolução do Conselho Nacional do

Meio Ambiente nº357/05; ii) 3,5 mg i.a.L⁻¹ - representando a concentração recomendada para o controle de pragas aquáticas e terrestres (Giesy *et al.*, 2000; Vera *et al.*, 2012) e iii) 6,0 mg i.a.L⁻¹ - representando a concentração próxima a maior já encontrada em ambientes aquáticos naturais (Edwards *et al.*, 1980). Para os testes envolvendo o AMPA (pureza $\geq 99\%$; CAS: 1066-51-9), foi utilizada somente a concentração de 0,03 mg L⁻¹, que representa o valor médio reportado em ambiente lóticos (Villeneuve *et al.* 2011; Coupe *et al.*, 2012). Adicionalmente, foi testado um grupo controle (0 mg L⁻¹) para cada herbicida analisado.

O delineamento empregado neste experimento seguiu as diretrizes da Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCDE) para o teste de produtos químicos 221 (OCDE, 2011). Os procedimentos de exposição descritos nestas diretrizes, embora propostos para *Lemna* sp., também têm sido aplicados às macroalgas verdes (Oliveira *et al.*, 2016). Este delineamento consiste em um teste semi-estático com análise de resposta no primeiro (T1) e no sétimo dia (T7) após a exposição ao herbicida e com a renovação do meio de cultura no terceiro e quinto dia para evitar a perda de nutrientes e de ingredientes ativos (Nešković *et al.*, 1996; OECD, 2011).

Os efeitos dos tratamentos experimentais sobre as macroalgas verdes foram mensurados pelas variações nas respostas fotossintéticas dos grupos tratados (ou seja, sob exposição aos herbicidas testados) em relação ao grupo controle (ou seja, na ausência de exposição aos herbicidas testados). As respostas fotossintéticas foram analisadas, concretamente, através de parâmetros fotossintéticos obtidos/calculados de cada amostra a partir dos seguintes métodos analíticos: i) evolução do oxigênio dissolvindo, com a aplicação da técnica dos frascos claros e escuros; ii) fluorescência da clorofila *a*, com auxílio de fluorômetro subaquático e iii) concentração de clorofila *a*, por meio de método espectrofotométrico.

A evolução do oxigênio dissolvido no meio, obtida através da técnica dos frascos claros e escuros (Littler & Arnold, 1985; Thomas, 1988), foi utilizada na determinação das taxas de fotossíntese líquida e respiração no escuro das amostras de macroalgas verdes para cada tratamento experimental, incluindo os grupos controle. Os procedimentos adotados para a execução deste método seguiram aqueles descritos por Necchi & Zucchi (2001) e Vieira & Necchi (2003). Assim, para a análise da fotossíntese líquida, cinco amostras foram colocadas em frascos de 110 mL de vidro com 98,5 % de transparência (os chamados frascos claros), contendo meio Básico de Bold e, então, mantidas em incubação em condições constantes de temperatura ($20 \pm 0,5^\circ\text{C}$), irradiância ($140 \pm 15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e agitação ($100 \pm 2,5$ r.p.m.) pelo período de uma hora. Um procedimento semelhante foi utilizado para a análise da respiração no escuro, onde três amostras algais foram mantidas em frascos cobertos com papel alumínio

em condições de ausência absoluta de iluminação (os chamados frascos escuros). As concentrações inicial (ou seja, medida antes do período de incubação) e final do oxigênio dissolvido no meio (ou seja, medida após o período de incubação) para cada tratamento em cada dia da análise (T1 e T7) foram mensuradas com o uso de um oxímetro de bancada equipado com uma sonda com auto-agitação (Yellow Springs Instruments, modelo 5100).

As medidas de fluorescência da clorofila *a*, por sua vez, foram realizadas utilizando o fluorômetro subaquático Diving-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Após o período de aclimação das amostras de macroalgas verdes ao escuro (30 minutos – Lichtenthaler *et al.*, 1981; Yannicari *et al.*, 2012), nos dias T1 e T7, cinco réplicas de cada tratamento foram submetidas a um teste de "Curva de Indução" (Schreiber *et al.*, 1995), utilizando-se luz actínica com intensidade de $285 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, e pulsos de saturação a cada 15 segundos, com duração de 0,8 segundos e intensidade de $2000 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Os parâmetros do fotossistema II (PSII) mensurados a partir dos dados gerados neste teste foram: rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) (Genty *et al.*, 1989; Necchi, 2005; Schreiber *et al.*, 1995); “quenching” fotoquímico (qP) (Baker & Rosenqvist, 2004); dissipação de calor no complexo antena do PSII (D) (Demmig-Adams *et al.*, 1996) e dissipação de calor pelo centro de reação do PSII (E) (Demmig-Adams *et al.*, 1996).

Após a realização das análises de fotossíntese líquida, respiração no escuro e dos parâmetros relacionados à fluorescência da clorofila *a*, as amostras de macroalgas verdes foram submetidas às análises de concentração de clorofila *a*, corrigida da feofitina, por método espectrofotométrico (Biospectro modelo SP220). As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda 665 e 750 nm, utilizando-se acetona 90% para a calibração (branco da amostra) (Wetzel & Likens, 2000).

Os resultados foram submetidos inicialmente a estatística descritiva, ao teste de normalidade Ryan-Joiner e ao teste de igualdade de variâncias pelo método Levene. Em seguida, com o intuito de comparar/agrupar as médias dos parâmetros medidos/calculados para as espécies e/ou tratamentos com as diferentes concentrações dos herbicidas glifosato grau técnico e Roundup® foi realizada, para os dados paramétricos, a análise de variância de Scott-Knott, (Scott & Knott, 1974), utilizando o programa Sisvar (Ferreira, 2000), ou a análise de Kruskal-Wallis seguido pelo post-hoc de Dunn (Dunn, 1964), para os dados não paramétricos, utilizando o software PAST (Hammer *et al.*, 2001). Para os experimentos envolvendo o herbicida AMPA a comparação/agrupamento das médias experimentais foi aplicado o teste *t* de Student para amostra não pareadas (dados paramétricos) ou o teste de Mann-Witney (dados não paramétricos). Ambos testes estatísticos foram realizado com o uso do software Minitab, versão

17 (Ryan *et al.*, 1985). Os efeitos das interações das concentrações experimentais e o tempo de exposição sobre as respostas fotossintéticas das macroalgas verdes testadas foram avaliadas pela da Análise de Variância Multivariada (MANOVA), com uso do software Minitab, versão 17 (Ryan *et al.*, 1985). Para a construção dessas análises, as respostas fotossintéticas (ou seja, os parâmetros fotossintéticos medidos ou calculados) foram consideradas variáveis dependentes, enquanto que o tempo de exposição e as concentrações experimentais como covariáveis. Quando os pressupostos de normalidade e de igualdade de variância não foram alcançados, as interações entre concentração do herbicida e tempo de exposição foram investigadas usando uma Análise Multivariada de Permutação não paramétrica (PERMANOVA), com base na distância euclidiana e aplicando-se 9.999 permutações. Esta análise foi realizada no software PAST (Hammer *et al.*, 2001).

Resultados

Respostas fotossintéticas aos tratamentos experimentais utilizando glifosato grau técnico

Evolução do oxigênio dissolvido

Os resultados obtidos para as variáveis taxa de fotossíntese líquida e respiração no escuro, assim como das análises multivariadas estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Todas as diferenças significativas nas taxas de fotossíntese líquida e respiração no escuro dos tratamentos em relação ao grupo controle, em T1, foram reportadas nas maiores concentrações experimentais (3,5 e 6 mg L⁻¹). Para a taxa de fotossíntese líquida, houve aumento dos valores para *Oedogonium* sp., da ordem de +71,2% na concentração de 3,5 mg.L⁻¹ e de +77,3% na concentração de 6 mg L⁻¹ (F = 6,8 e $p \leq 0,01$). Houve também redução da taxa de fotossíntese líquida para *Desmidium grevillei*, com queda de -66,7% reportada para a concentração de 6 mg L⁻¹ (F = 5,3 e $p \leq 0,01$) (Tabela 2).

Para a respiração no escuro, houve aumentos significativos reportados para *Oedogonium* sp., com incremento de +915,2% na concentração de 6 mg L⁻¹ (F = 6,8 e $p \leq 0,01$), e também para *Nitella subglomerata*, com aumento de +174,3% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de +124,8% na concentração de 6 mg L⁻¹ (F = 7,7 e $p \leq 0,01$) (Tabela 2).

Em relação as análises após sete dias de exposição ao glifosato (T7), em geral, os aumentos anteriormente reportados não se repetiram. Com exceção do *Oedogonium* sp., que manteve o aumento da taxa de respiração na concentração de 6 mg L⁻¹ (+660,7%) (F = 4,7 e $p \leq 0,05$), houve reduções na taxa de fotossíntese líquida para *Desmidium grevillei* e *Spirogyra* sp. (Tabela 2). *D. grevillei* registrou uma queda de -20,1% na taxa fotossintética na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de -40% na concentração de 6 mg L⁻¹ (F = 9,6 e $p \leq 0,001$),

enquanto que para *Spirogyra* sp. houve uma queda ainda mais acentuada nestes valores (-61%) na concentração de 0,28 mg L⁻¹, embora, o teste de Mann-Witney tenha mostrado que essa queda difere estatisticamente das demais concentrações (3,5 e 6 mg L⁻¹) e não do grupo controle ($H = 12,5$ e $p \leq 0,01$) (Tabela 2).

Na análise de variância multivariada, os efeitos significativos de interação entre o tempo de exposição e tratamento foram reportados para a taxa de fotossíntese líquida de *Spirogyra* sp. ($F = 6,45$ e $p \leq 0,01$) e para a taxa de respiração de *Nitella subglomerata* ($F = 4,17$ e $p \leq 0,05$) e de *Desmidium grevillei* ($F = 3,27$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 3).

Clorofila a

As concentrações de clorofila *a* nas análises com glifosato, mostrados na Tabela 2, apresentam variação significativa nos tratamentos experimentais quando os valores foram comparados com o grupo controle principalmente após um dia de exposição ao herbicida. Neste sentido, foram observadas reduções nas concentrações de clorofila *a*, em T1, para *Oedogonium* sp., equivalente a -28,4% para a concentração de 0,28 mg L⁻¹, de -27,7% para a concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de -36,8% para a concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 4,9$ e $p \leq 0,01$) e para *Spirogyra* sp., com queda de -31% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, de -38,2% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de -51,7% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 4,2$ e $p \leq 0,05$) (tabela 2). Por outro lado, nas concentrações de 3,5 mg L⁻¹ e de 6 mg L⁻¹, as concentrações de clorofila *a* de *Desmidium grevillei* registraram maiores valores, com aumento de +131,6% e +78,7% em relação ao grupo controle, respectivamente (Tabela 2).

Nas análises realizadas em T7, houve variações significativas nos valores de clorofila *a* em relação ao grupo controle somente na concentração de 3,5 mg L⁻¹, com aumento de +138,7% nas amostras de *Nitella subglomerata* ($F = 5,9$ e $p \leq 0,01$) e redução de -59,5% nas amostras de *Desmidium grevillei* ($F = 5,6$ e $p \leq 0,01$) (Tabela 2).

As interações entre tempo de exposição e tratamento foram significativas para *Oedogonium* sp. ($F = 5,35$ e $p \leq 0,05$) e *Desmidium grevillei* ($F = 8,9$ e $p \leq 0,01$) (Tabela 3).

Fluorescência da clorofila a

Os valores dos parâmetros observados/calculados, assim como o resultado das análises de variância estão apresentadas na Tabela 4 e nas Figuras 1 e 2.

Os resultados experimentais mostraram que os testes realizados com a concentração de 0,28 mg L⁻¹ apresentaram poucos efeitos significativos para os parâmetros analisados a partir

da técnica de fluorescência da clorofila *a*. Adicionalmente, os poucos efeitos observados o foram, principalmente, após um dia de exposição (T1).

Oedogonium sp. apresentou, em T1, um claro aumento no rendimento fotossintético (Fig. 1) para os testes realizados com as concentrações de 3,5 mg L⁻¹ e 6 mg L⁻¹. Para estas concentrações, houve redução nos valores do parâmetro que indica a dissipação de calor no complexo antena (D) da ordem de -9,8% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de -12,6% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 9,4$ e $p \leq 0,001$). Concomitantemente, foi reportado o aumento do rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}), da ordem de +84,5% na concentração de 3,5 mg.L⁻¹ e +73,6% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 14,2$ e $p \leq 0,001$), e do “quenching” fotoquímico (qP), da ordem de +62,3% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de +47,2% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 11$ e $p \leq 0,001$) (Figs. 1 e 2).

Nitella subglomerata, por sua vez, mostrou, em T1, aumento na dissipação de calor pelo centro de reação (E), com variações, em relação ao grupo controle, de +46,1% sob a concentração experimental de 0,28 mg L⁻¹, de +47,7% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de +41,5% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 4,2$ e $p \leq 0,05$) (Figs. 1). Quanto ao parâmetro (qP), *N. subglomerata* registrou uma redução de -52,6% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, ao passo que nas concentrações de 3,5 mg L⁻¹ e de 6 mg L⁻¹ este parâmetro registrou aumentos da ordem de +52,7% e +57,5%, respectivamente ($F = 4,2$ e $p \leq 0,05$) (Fig. 2). Outro parâmetro proveniente da fluorescência da clorofila *a* que, assim como (qP), também registrou aumento nos seus valores, em relação ao grupo controle, foi o (Φ_{PSII}), que experimentou variação da ordem de +184,6% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e +185,8% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 33,7$ e $p \leq 0,001$). Para *N. subglomerata* também foram reportadas reduções nos valores do parâmetro (D), da ordem de -16,1% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, de -32,8% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de -30,5% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 11,3$ e $p \leq 0,001$) (Figs. 1 e 2).

Em T1, *Spirogyra* sp. apresentou nas concentrações de 3,5 mg L⁻¹ e 6 mg L⁻¹ aumento no parâmetro (E), equivalente a +31% em relação ao grupo controle na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de +22,1% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 17,6$ e $p \leq 0,001$). Registrou-se também uma redução nos valores do parâmetro (D), com queda de -26% em relação ao grupo controle na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de -24,1% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 12,9$ e $p \leq 0,001$). Para estas mesmas concentrações, houve aumento do parâmetro (E) de +31% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de +22,1% na concentração de 6 mg L⁻¹ em relação ao controle ($F = 17,6$ e $p \leq 0,001$) (Fig. 1).

Os resultados experimentais após sete dias de exposição ao herbicida (T7) para *Oedogonium* sp. e *N. subglomerata* mostraram baixos valores de dissipação de calor pelo

complexo antena (D) e altos valores de energia direcionada para as etapas fotoquímica da fotossíntese (Φ_{PSII} e qP).

De forma similar aos resultados observados em T1, *Oedogonium* sp. apresentou, em T7, aumento do parâmetro (Φ_{PSII}), registrando variação de +73,5% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e +85,3% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 21,4$ e $p \leq 0,001$). Para esta espécie, o (qP) calculado para as amostras submetidas à concentração de 3,5 mg L⁻¹ variou em +79,3% o seu valor quando comparado ao controle, ao passo que na concentração de 6 mg L⁻¹ o aumento foi de +79,9% ($F = 7,1$ e $p \leq 0,01$). As reduções dos valores de (E) ocorreram tanto na concentração de 3,5 mg L⁻¹ (-37,4% em relação ao grupo controle) como na de 6 mg L⁻¹ (-35,7%) ($F = 4,2$ e $p \leq 0,05$). Do mesmo modo, foram registradas reduções nos valores de (D) na presença dos herbicidas quando comparados ao grupo controle: -9,5% na concentração de 0,28 mg L⁻¹; -21,2% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e -27,2% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 29,2$ e $p \leq 0,001$) (Figs. 1 e 2).

Diferentemente dos resultados observados em T1 para *Nitella subglomerata*, na análise após sete dias de exposição ao herbicida (T7) não houve aumento significativo no parâmetro (E), mantendo-se apenas os aumentos do parâmetro (Φ_{PSII}) (+276,3% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de +330% na concentração de 6 mg L⁻¹) ($F = 45,9$ e $p \leq 0,001$) e do parâmetro (qP) (+33% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, de +109,5% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de +115,4% na concentração de 6 mg L⁻¹) ($F = 103,5$ e $p \leq 0,001$). A redução do valor do parâmetro (D) observada em T1 foi mantida somente nas concentrações de 3,5 mg L⁻¹ (-85,7% em relação ao controle) e de 6 mg L⁻¹ (-111%) ($F = 12,7$ e $p \leq 0,001$) (Figs. 1 e 2).

Para *Spirogyra* sp., em T7, observou-se somente um aumento nos valores do parâmetro (qP), da ordem de +81,5%, na concentração de 0,28 mg L⁻¹ ($F = 4,9$ e $p \leq 0,01$) (Fig. 2).

Entre os parâmetros analisados pela análise de variância multivariada, destaca-se o parâmetro (D) por ter apresentado efeitos significativos do tratamento e/ou interação entre tempo de exposição e tratamento em todas as macroalgas analisadas (Tabela 4).

Respostas fotossintéticas aos tratamentos experimentais utilizando a formulação Roundup®

Evolução do oxigênio dissolvido

As análises das macroalgas expostas ao Roundup®, apresentados nas Tabelas 5 e 6, mostraram, em geral, reduções nas taxas de fotossíntese líquida e respiração no escuro, e um alto número de respostas significativas para a interação entre tempo de exposição e tratamento.

Em T1, *Spirogyra* sp. apresentou redução da taxa de fotossíntese líquida somente na concentração de 6 mg L⁻¹ (-30,9% em relação ao grupo controle) ($F = 8,9$ e $p \leq 0,01$) (Tabela

5) ao passo que, *Nitella subglomerata* e *Desmidium grevillei* apresentaram reduções em todas as concentrações analisadas. Para *Nitella subglomerata* houve redução da taxa de fotossíntese líquida da ordem de -36,7% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, de -41,2% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e -39,9% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($H = 8,1$ e $p \leq 0,05$). Para *Desmidium grevillei*, por sua vez, as reduções foram de -54,6% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, de -37,9% na concentração de 3,5 mg L⁻¹ e de -44,3% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 11$ e $p \leq 0,001$) (Tabela 5).

As amostras de *Oedogonium* sp. apresentaram variações na taxa de respiração, em T1, da ordem de -64,1% na concentração experimental de 0,28 mg L⁻¹, -69,3% na concentração de 3,5 mg L⁻¹, e -71,8% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 198,9$ e $p \leq 0,001$) (Tabela 5).

Em relação as análises realizadas em T7, os efeitos significativos nas taxas de fotossíntese líquida e respiração foram ainda mais recorrentes entre as macroalgas.

Um único caso de aumento da taxa de fotossíntese líquida foi reportado para *Oedogonium* sp. na concentração de 0,28 mg L⁻¹, com aumento de +59,2% ($F = 5,1$ e $p \leq 0,01$). Nas espécies *Nitella subglomerata* e *Spirogyra* sp. houve reduções da taxa de fotossíntese líquida em T7 nas maiores concentrações. Em *Nitella subglomerata* foi reportada a queda de -42,2% na concentração de 3,5 mg L⁻¹, e -53% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 11$ e $p \leq 0,001$); para *Spirogyra* sp. a queda foi de -47,6% na concentração de 3,5 mg L⁻¹, e -54,3% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 4,2$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 5).

Novamente, *Oedogonium* sp. apresentou um resultado distinto das demais macroalgas em T7, com aumento da taxa de respiração em +74,4% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, +241,1% na concentração de 3,5 mg L⁻¹, e +239,9 na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 6,6$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 5).

Nitella subglomerata e *Spirogyra* sp. mostraram o mesmo padrão de queda na taxa de respiração em T7, com reduções em todas as concentrações. Essa redução em *Nitella subglomerata* correspondeu a -74,8% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, -73,8% na concentração de 3,5 mg L⁻¹, e -77,9% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 6,4$ e $p \leq 0,05$). Já *Spirogyra* sp. registrou queda de -60,2% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, -66,4% na concentração de 3,5 mg L⁻¹, e -56,4% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 6,4$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 5).

As análises de *Desmidium grevillei* também apresentaram uma redução da taxa de respiração da ordem de -55,1% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, e -35,6% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 13,1$ e $p \leq 0,01$) (Tabela 5).

As análises de variância multivariada revelaram efeitos significativos de interação entre o tempo de exposição e tratamento para a taxa de fotossíntese líquida de *Oedogonium* sp. ($F =$

6,95 e $p \leq 0,05$) e *Nitella subglomerata* ($F = 4,76$ e $p \leq 0,05$), e para a taxa de respiração de *Oedogonium* sp. ($F = 24,31$ e $p \leq 0,01$), *Spirogyra* sp. ($F = 4,71$ e $p \leq 0,05$) e *Desmidium grevillei* ($F = 3,34$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 6).

Clorofila *a*

Os resultados das análises de concentrações de clorofila *a* das macroalgas verdes expostas ao Roundup® estão sumarizados nas Tabelas 5 e 6.

Spirogyra sp. apresentou variações significativas em T1, com redução de -50,4% para a concentração de 3,5 mg L⁻¹, e -53,3% para a concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 4,7$ e $p \leq 0,01$) (Tabela 5).

Para *Nitella subglomerata* e *Spirogyra* sp., em T7, houve redução nos valores de clorofila *a* em todas as concentrações. *Nitella subglomerata* ($F = 5,1$ e $p \leq 0,01$) apresentou uma queda de -37,8% para a concentração de 0,28 mg L⁻¹, de -45,9% para a concentração de 3,5 mg L⁻¹, e de -55,1% para a concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 5,1$ e $p \leq 0,01$). Em *Spirogyra* sp. as reduções foram da ordem de -66,5% para a concentração de 0,28 mg L⁻¹, de -87% para a concentração de 3,5 mg L⁻¹, e de -92,6% para a concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 21,3$ e $p \leq 0,001$) (Tabela 5).

Desmidium grevillei também apresentou uma redução dos valores de clorofila *a* em T7, com queda de -53,8% para a concentração de 3,5 mg L⁻¹, e -46% para a concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 7,9$ e $p \leq 0,001$) (Tabela 5).

Os efeitos de interação entre o tempo de exposição e tratamento na concentração de clorofila *a* foram significativos para *Spirogyra* sp. ($F = 6,98$ e $p \leq 0,01$) e *Desmidium grevillei* ($F = 3,7$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 6).

Fluorescência da clorofila *a*

Os resultados da fluorescência da clorofila *a* e da análise de variância multivariada para a exposição ao Roundup®, apresentados nas Figuras 3 e 4 e na Tabela 7, respectivamente, denotam majoritariamente o aumento da dissipação de energia através de calor (revelado pelos parâmetros D e E).

Em T1, *Nitella subglomerata* apresentou, em todas as concentrações, aumento do parâmetro (E) da ordem de +46% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, +28,2% na concentração de 3,5 mg L⁻¹, e +49,3% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 7,4$ e $p \leq 0,01$). Em contrapartida, houve uma queda no parâmetro (Φ_{PSII}), de -42,6% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, -37,9% na

concentração de 3,5 mg L⁻¹, e -46,3% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 7,1$ e $p \leq 0,01$). De forma similar o parâmetro (qP) apresentou uma redução da ordem de -44,1% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, -35,2% na concentração de 3,5 mg L⁻¹, e -48,3% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 7,3$ e $p \leq 0,01$) (Figs. 3 e 4).

Desmidium grevillei, em T1, apresentou aumento do parâmetro (E) da ordem de +9,8% na concentração experimental de 3,5 mg L⁻¹, e +12,2% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 3,5$ e $p \leq 0,05$). Por sua vez, *Oedogonium* sp mostrou uma redução no parâmetro (Φ_{PSII}) da ordem de -14,5% para a concentração de 6 mg L⁻¹, ($F = 7,1$ e $p \leq 0,01$) (Fig. 3).

Nitella subglomerata, em T7, mostrou indícios de aclimação para a concentração de 0,28 mg L⁻¹, em que apresentou aumento de +12,5% no parâmetro (D) ($F = 4,4$ e $p \leq 0,05$). As concentrações de 3,5 mg L⁻¹ e de 6 mg L⁻¹ mantiveram em T7 o aumento no parâmetro (E), com +13,3% na concentração de 3,5 mg L⁻¹, e +27,6% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 9,5$ e $p \leq 0,01$). Para estas concentrações houve também a redução do parâmetro (qP) da ordem de -12,8% para a concentração de 3,5 mg L⁻¹, e -23,2% para a concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 4,5$ e $p \leq 0,05$) (Figs. 3 e 4).

As amostras de *Desmidium grevillei* também mantiveram em T7 do parâmetro (E), com aumento de +7,8% na concentração de 3,5 mg L⁻¹, e +10,7% na concentração de 6 mg L⁻¹ ($F = 5,2$ e $p \leq 0,01$). Entretanto, para a concentração de 3,5 mg L⁻¹, juntamente com a concentração de 0,28 mg L⁻¹, houve aumento no parâmetro (Φ_{PSII}) da ordem de +35,9% na concentração de 0,28 mg L⁻¹, e +26,3% na concentração 3,5 mg L⁻¹ ($F = 4,3$ e $p \leq 0,05$). A mesma tendência foi observada para o parâmetro (qP), com aumento de +24,7% para a concentração de 0,28 mg L⁻¹, e +13,6% para a concentração de 3,5 mg L⁻¹ ($F = 6,2$ e $p \leq 0,01$) (Figs. 3 e 4).

Na análise de variância multivariada destaca-se a maior sensibilidade de *Nitella subglomerata* ao Roundup®, que apresentou efeitos de interação entre o tempo de exposição e tratamento nos parâmetros (qP) ($F = 2,77$ e $p \leq 0,05$), (D) ($F = 4,14$ e $p \leq 0,05$), e (E) ($F = 4,3$ e $p \leq 0,05$), além do efeito significativo do tratamento no parâmetro (Φ_{PSII}) ($F = 4,45$ e $p \leq 0,01$) (Tabela 7).

Respostas fotossintéticas aos tratamentos experimentais utilizando o tratamento com AMPA

Evolução do oxigênio dissolvido

Os resultados das análises das macroalgas verdes expostas ao AMPA sobre as taxas de fotossíntese líquida e respiração no escuro (Tabela 8), assim como as respostas significativas encontradas na análise de variância multivariada (Tabela 9), evidenciaram uma maior sensibilidade das macroalgas *Oedogonium* sp. e *Spirgyra* sp. em relação as demais macroalgas.

Somente as macroalgas *Oedogonium* sp. e *Spirogyra* sp. apresentaram reduções na taxa de fotossíntese líquida. Para *Oedogonium* sp. houve queda de -21% em T1 ($t = 2,2$ e $p \leq 0,05$) e de -33,4% em T7 ($t = 4$ e $p \leq 0,01$). Em *Spirogyra* sp. a redução foi da ordem de -75,1% quando comparado ao grupo controle ($t = 3,6$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 8).

Para a taxa de respiração no escuro, houve somente uma redução de -66% para *Oedogonium* sp. em T1 ($t = 27,9$ e $p \leq 0,001$) (Tabela 8).

Efeitos de interação entre o tempo de exposição e tratamento foram reportados para *Oedogonium* sp. na taxa de fotossíntese líquida ($F = 11,3$ e $p \leq 0,01$) e respiração no escuro ($F = 8,13$ e $p \leq 0,05$), e para *Spirogyra* sp. também para a taxa de fotossíntese líquida ($F = 14,2$ e $p \leq 0,01$) e respiração no escuro ($F = 7,82$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 9).

Clorofila *a*

Os resultados das análises de clorofila *a*, apresentados nas Tabelas 8 e 9, mostraram uma queda significativa na concentração de clorofila *a* para as macroalgas *Nitella subglomerata* e *Spirogyra* sp. *Nitella subglomerata* apresentou uma redução de -19,9% em T1 ($t = 2,7$ e $p \leq 0,05$), enquanto que para *Spirogyra* sp. a redução foi da ordem de -55,5% em T7 ($t = 2,5$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 8).

Somente *Spirogyra* sp. apresentou efeitos significativos de interação entre o tempo de exposição e tratamento para a concentração de clorofila *a* ($F = 39,82$ e $p \leq 0,01$) (Tabela 9).

Fluorescência da clorofila *a*

Assim como nas análises de fotossíntese líquida e respiração no escuro, houve poucas variações significativas no tratamento com 0,03 mg L⁻¹ de AMPA em relação ao grupo controle. Os valores de cada parâmetro analisado estão disponíveis nas Figuras 5 e 6, e os resultados da análise de variância multivariada se encontram na Tabela 10.

Com exceção do aumento no parâmetro (E) da ordem de +37,5% para *Nitella subglomerata* em T1 ($t = 2,7$ e $p \leq 0,05$), somente a macroalga *Spirogyra* sp. apresentou variações significativas em relação a grupo controle (Fig. 5).

Spirogyra sp. apresentou, em T1, uma redução de -12,5% no parâmetro (D) ($t = 3$ e $p \leq 0,05$), e aumento de +10,9% no parâmetro (Φ_{PSII}) ($t = -2,8$ e $p \leq 0,05$) (Fig. 5).

Em T7, houve uma mudança dos efeitos observados em T1 para *Spirogyra* sp., com aumento de +27,3% no parâmetro (E) ($t = -5,3$ e $p \leq 0,01$), e reduções de -64,8% no parâmetro (Φ_{PSII}) ($t = 4,5$ e $p \leq 0,01$), e de -67,3% no parâmetro (qP) ($t = 4,6$ e $p \leq 0,01$) (Figs. 5 e 6).

Novamente, *Spirogyra* sp. se destaca pelo número de efeitos significativos na análise de variância multivariada, apresentando efeitos de interação entre o tempo de exposição e tratamento nos parâmetros (Φ_{PSII}) ($F = 28,93$ e $p \leq 0,01$), (qP) ($F = 22,09$ e $p \leq 0,01$), e (E) ($F = 7,18$ e $p \leq 0,05$), e efeito do tratamento no parâmetro (D) ($F = 12,45$ e $p \leq 0,01$) (Tabela 10).

Discussão

Quando expostas ao glifosato, as macroalgas *Nitella subglomerata* (T1 e T7), *Oedogonium* sp. (T1 e T7) e *Spirogyra* sp. (T1) apresentaram uma marcante redução da dissipação de energia pelo complexo antena (D), principalmente nas concentrações de 3,5 e de 6 mg L⁻¹ (Figs. 1 e 2). Resultado semelhante foi encontrado por Gomes *et al.* (2017) em um estudo sobre o efeito do glifosato na fotossíntese de salgueiro *Salix miyabeana*, que embora trate de uma espécie de angiospermas, apresenta mecanismo fotossintético muito semelhante ao das Chlorophyta. Os autores verificaram que, após 24 horas de exposição, a concentração de carotenoides, incluindo o β -caroteno que é um dos precursores da zeaxantina, foi reduzida, afetando o ciclo da violaxantina, pelo qual concluíram que tal redução produziu uma queda na dissipação de energia pelo complexo antena (neste caso, verificado pelo valor do parâmetro "quenching" não-fotoquímico ou NPQ). Estes mesmos autores verificaram ainda que esta redução na concentração de carotenoides acabou por prejudicar o mecanismo de fotoproteção da planta, acarretando em danos ao aparato fotossintético. No presente trabalho, os aumentos da dissipação de energia pelo centro de reação (E), associados às reduções na concentração da clorofila *a* para, por exemplo, *Spirogyra* sp. em T1, também indicam que houve dano no centro de reação, gerado, provavelmente, pela formação de espécies reativas de oxigênio (Gomes *et al.*, 2014; 2017; Mantoan *et al.*, 2016).

Por sua vez, os aumentos nos valores do parâmetro Φ_{PSII} observados para *Nitella subglomerata* e *Oedogonium* sp., associados aos aumentos observados na respiração no escuro e na taxa de fotossíntese líquida, indicam que essas macroalgas apresentaram um aumento na taxa metabólica (Tabela 2, Fig. 1). Outros trabalhos também reportaram o aumento da taxa metabólica em plantas expostas a herbicidas e vários destes trabalhos interpretam tal aumento como uma estratégia desses organismos de tentarem inativar metabolicamente o glifosato de uma forma mais rápida (Duke *et al.*, 2006; Cedergreen, 2008; Cedergreen & Olesen, 2010).

Curiosamente, quando há a redução da produtividade fotossintética, como no caso de *Desmidium grevillei* (tanto em T1 como em T7) (Tabela 2), essa não apresenta, aparentemente, relação com danos ao centro de reação do fotossistema II (Fig. 1). Isto indica que o efeito do glifosato na redução da taxa de fotossíntese líquida, para as macroalgas verdes, pode estar

relacionado com um dreno de carbono do ciclo de Calvin para a via metabólica do chiquimato (Geiger *et al.*, 1986; 1987; Shieh *et al.*, 1991). Adicionalmente, os resultados da MANOVA mostraram que o parâmetro (D) foi a varável dependente com mais respostas significativas entre as macroalgas testadas (Tabela 3). Estes resultados demonstram que o parâmetro (D) pode ser considerado como um bom indicador de alterações na resposta fotossintética provocadas pelo glifosato nas macroalgas verdes.

De forma distinta, as espécies de macroalgas expostas ao tratamento com Roundup® não apresentaram redução nos valores do parâmetro (D), mas mantiveram um aumento nos valores do parâmetro (E) associado à redução da concentração de clorofila *a*. A exceção a este padrão de resposta fotossintética foi *Spirogyra* sp., espécie que não apresentou qualquer efeito significativo detectado pela análise de fluorescência da clorofila *a*, mesmo apresentando reduções na concentração de clorofila *a* e nas taxas de fotossíntese líquida, em T1 e T7 (Tabela 5; Fig. 3 e 4). Foi reportado para o tratamento com Roundup® um único caso de aumento da taxa metabólica, que ocorreu em T7, para *Oedogonioum* sp. Neste caso, a macroalga registrou aumento na taxa de fotossíntese líquida na concentração de 0,28 mg i.a.L⁻¹ e na respiração no escuro nas concentrações de 3,5 mg i.a.L⁻¹ e de 6 mg i.a.L⁻¹. Adicionalmente, nos experimentos com Roundup® foi verificado um possível evento de aclimação de *Nitella subglomerata* ao longo do processo de exposição ao herbicida para a concentração de 0,28 mg i.a.L⁻¹. Assim, de forma distinta do que foi reportado em T1, observou-se, em T7, que *Nitella subglomerata* aumentou os valores do parâmetro (D) e manteve a taxa de fotossíntese líquida próxima ao do grupo controle, revelando sua potencial capacidade de ajuste fisiológico para evitar danos ao centro de reação (Demmig-Adams *et al.*, 1996; Klughammer & Schreiber, 2008). Estes resultados reportados para *Nitella subglomerata* diferem consideravelmente da resposta fotossintética de *Nitella microcarpa* var. *wrightii*, submetida ao Roundup®, que apresentou reduções significativas na taxa de fotossíntese líquida mesmo na concentração de 0,28 mg i.a.L⁻¹ (Oliveira *et al.*, 2016), sugerindo que a sensibilidade das algas a exposição ao glifosato seja espécie-específica (Vera *et al.*, 2010; 2012).

As reduções significativas nos valores da taxa de fotossíntese líquida e nos parâmetros (Φ_{PSII}) e (qP) reportadas para as macroalgas analisadas permite concluir que a formulação comercial, assim como observado em outros trabalhos (Sáenz & Di Marzio, 2009; Tsui & Chu, 2003; Lipok *et al.*, 2010), é mais prejudicial que o princípio ativo (glifosato grau técnico). Os efeitos nocivos da formulação comercial podem estar relacionados as substâncias adjuvantes, não somente por facilitarem a entrada do glifosato, potencializando seu efeito (Carvalho, 2013),

mas também pelo efeito tóxico próprio dessas substâncias (Tsui & Chu, 2003; Lipok *et al.*, 2010; Székács *et al.*, 2014).

Em relação ao tamanho das concentrações utilizadas para glifosato grau técnico e Roundup® sobre o nível dos efeitos nocivos produzidos, em geral, houve uma distinção nos padrões de respostas fotossintéticas gerados pela concentração de 0,28 mg L⁻¹ quando comparada às maiores concentrações (3,5 mg L⁻¹ e 6 mg L⁻¹), o que corrobora em parte com a primeira hipótese deste trabalho. Embora a concentração de 0,28 mg L⁻¹ não tenha afetado tanto as macroalgas como as demais concentrações, ela foi capaz de gerar reduções consideráveis na concentração de clorofila *a* (*Oedogonium* sp., *Nitella subglomerata* e *Spirogyra* sp.) e na taxa de fotossíntese líquida (*Nitella subglomerata* e *Desmidium grevillei*), além do aumento no valor do parâmetro (E) (*Nitella subglomerata*). Estes resultados demonstram que a concentração máxima permitida pelo CONAMA também é capaz de afetar a resposta fotossintética dessas macroalgas.

Quando expostas ao AMPA, as espécies de macroalgas analisadas apresentaram padrões de resposta distintos entre si. *Desmidium grevillei*, por exemplo, não mostrou qualquer efeito significativo sobre os parâmetros fotossintéticos analisados pelas técnicas utilizadas. *Nitella subglomerata* (T1) e *Spirogyra* sp. (T7), por outro lado, revelaram a ocorrência de danos no aparato fotossintético (sinalizados pelo aumento nos valores do parâmetro (E) e redução da concentração de clorofila *a*). No entanto, somente *Spirogyra* sp. apresentou redução da taxa de fotossíntese líquida e nos valores dos parâmetros (Φ_{PSII}) e (qP). Para *Oedogonium* sp. (em T1 e em T7) foi verificada a redução na taxa de fotossíntese líquida sem, entretanto, qualquer outro efeito significativo, seja nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* ou na concentração de clorofila *a*, sugerindo novamente que, nesta espécie, tenha ocorrido um dreno de carbono no ciclo de Calvin (Tabela 8; Figs. 5 e 6). Adicionalmente, os efeitos reportados para *Oedogonium* sp. exposto ao AMPA mostraram mais inibições na resposta fotossintética quando comparado ao Roundup®, sendo este o único caso em que a segunda hipótese, referente ao maior efeito de inibição do Roundup®, não foi corroborada.

Considerando a diversidade de respostas fotossintéticas observadas para as macroalgas verdes frente à exposição ao AMPA e também que a concentração utilizada no presente experimento (qual seja, 0,03 mg L⁻¹) é compatível com valores reportados em ambientes lóticos (Villeneuve *et al.* 2011; Coupe *et al.*, 2012), os presentes resultados recomendam que os produtos de degradação dos princípios ativos utilizados no mercado de agroquímicos sejam mais estudados e monitorados nos ambientes aquáticos. O caso do AMPA é especialmente relevante, dado que este herbicida têm sido detectado em ambientes aquáticos com maior

frequência que o próprio princípio ativo que o deu origem, ou seja o glifosato (Daouk *et al.*, 2013; Battagli *et al.*, 2014; Poiger *et al.*, 2017).

Embora a concentração máxima de glifosato e AMPA estabelecida pelo Ministério da Saúde para água potável (ou seja, 0,5 mg L⁻¹ – Ministério da Saúde, 2011) não tenha sido testada no presente estudo, nem para o glifosato, nem para o AMPA e nem para a combinação de ambos, é seguro que esta concentração também ocasione oscilações consideráveis na produtividade fotossintética das macroalgas verdes, uma vez que foi testada, com efeito negativo confirmado, uma concentração menor do que este limite (0,28 mg L⁻¹). O fato de não haver um consenso entre os órgãos públicos brasileiros sobre os valores máximos permitidos para glifosato e AMPA, associado a falta de estudos prévios e exaustivos envolvendo espécies nativas, na adoção de concentrações legais limites, pode representar um grande risco para os ecossistemas lóticos tropicais. Os dados obtidos pelo presente estudo sinalizam exatamente neste sentido e sugerem que, eventualmente, estudos mais completos, envolvendo outros tipos de substâncias, mais espécies típicas de ecossistemas aquáticos e desenhos experimentais variados (p.ex., teste agudo vs teste crônico; substâncias isoladas vs combinação de substâncias; princípio ativo vs produto de degradação; doses legais vs doses reais encontradas na natureza, etc.) devam ser levados em consideração na determinação de parâmetros legais, de preferência universais, que atendam as especificidades dos ambientes aquáticos continentais brasileiros.

Do ponto de vista da comunidade de macroalgas como um todo, ao considerar a dinâmica de degradação do glifosato em AMPA à luz dos resultados obtidos no presente estudo, é possível inferir que a partir de um evento de contaminação as comunidades de macroalgas tendem a sofrer flutuações em cascata da produtividade fotossintética ao longo do tempo. Tais efeitos podem resultar em oscilações na composição e/ou na dominância das comunidades de produtores primários e/ou na estrutura dos ambientes lóticos. Neste sentido, a contaminação de um riacho tropical de baixa ordem por glifosato, poderia, por exemplo, estimular inicialmente a produção fotossintética de espécies de macroalgas tais como *Nitella subglomerata* e *Oedogonium* sp. e, posteriormente, ter este estímulo convertido em inibição à medida que a concentração de glifosato diminuísse e a de AMPA aumentasse ao longo do processo de degradação. Em contrapartida, espécies como *Desmidium grevillei* poderiam sofrer inibição na produtividade fotossintética quando inicialmente expostas a uma contaminação por glifosato, mas ao longo do tempo, com a degradação do glifosato em AMPA, poderiam experimentar um retomada deste processo aos seus padrões normais. Se for acrescentada nesta dinâmica o papel dos surfactantes, os cenários ficam ainda mais complexos. Por exemplo, na presença conjunta do glifosato com o surfactante nos ambientes aquáticos (contaminação por Roundup®, por

exemplo), os presentes resultados mostram que espécies como *Nitella subglomerata* deixariam de apresentar o aumento da taxa metabólica, que experimentariam quando expostas apenas ao glifosato puro, para sofrer forte inibições na sua produtividade fotossintética logo no início da exposição (os resultados do presente estudo mostram que esta inibição ocorreria já no primeiro dia após a exposição), que se estenderiam por um longo prazo (os resultados do presente estudo sugerem que esta inibição permaneceria após sete dias de exposição). Em relação a *Spirogyra* sp., por ter sido reportado danos no centro de reação do PSII e/ou perda de produtividade em todos os tratamentos (glifosato, Roundup® e AMPA) essa macroalga tende a ser a mais prejudicada por um evento de contaminação.

Portanto, é possível perceber com os resultados do presente estudo experimental que a presença de herbicidas nos ambientes aquáticos, seus princípios ativos, suas concentrações, suas dinâmicas de degradação, entre outros aspectos, podem influenciar fortemente as respostas fotossintéticas das macroalgas verdes, um dos grupos de produtores primários mais relevantes de ecossistemas lóticos tropicais de baixas ordens. Assim, dada esta relevante influência, não apenas nas respostas fotossintéticas das espécies individualmente, mas também, potencialmente, sobre toda a comunidade, sugere-se que estudos desta natureza se ampliem, de modo que possam ser testados outros herbicidas (isolados e em conjunto), outras espécies de outros filos algais e sob outros desenhos experimentais. Resultados oriundos de estudos desta natureza podem, seguramente, gerar informações relevantes sobre a dinâmica ecológica de rios e riachos tropicais e permitir a tomada de decisão mais consciente quanto ao manejo e proteção deste ecossistemas.

Referências Bibliográficas

Annett, R., Habibi, H.R., & Hontela, A. 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5), 458-479.

Baker, N.R. & Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of experimental botany*, 55(403): 1607-1621.

Battaglin, W.A., Meyer, M.T., Kuivila, K.M. & Dietze, J.E. 2014. Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. *Journal of the American Water Resources Association*, 50(2): 275-290.

Boutin, C., Lee, H.B., Peart, E.F., Batchaler, P.S. & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulphonylurea herbicide methylsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environmental toxicology and chemistry*, 19: 2532-2541.

Branco, L.H.Z. & Pereira, J.L. 2002. Evaluation of macroalgal communities along a gradient of organic pollution in a tropical stream. *Archiv für Hydrobiologie*, Stuttgart.

Cedergreen, N. 2008. Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time? *Environmental pollution*, 156(3): 1099-1104.

Cedergreen, N. & Olesen, C.F. 2010. Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pesticide biochemistry and physiology*, 96(3): 140-148

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. Resolução número 357 de 17 de março de 2005.

Coupe, R.H., Kalkhoff, S.J., Capel, P.D., & Gregoire, C. 2012. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest management science*, 68(1): 16-30.

Couture, G., Legris, J. & Langevin, R. 1995. Evaluation des impacts du glyphosate utilise dans le milieu forestier. Ministere des Ressources Naturelles, Direction de Penvironnement forestier, Service du suivi environnemental, Charles- bourg, Quebec, Canada.

Daouk, S., Copin, P.J., Rossi, L., Chèvre, N. & Pfeifer, H.R. 2013. Dynamics and environmental risk assessment of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in a small vineyard river of the Lake Geneva catchment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(9): 2035-2044.

Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., Barker, D.H., Logan, B.A., Bowling, D.R. & Verhoeven, A.S. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 98(2): 253-264.

DeNicola D.M., Hogland K.D. & Roemer S.C. 1992. Influence of canopy cover on spectral irradiance and periphyton assemblages in a prairie stream. *Journal of the North American Benthological Society* 11: 391-404.

Devine, M.D., Duke, S.O. & Fedtke, C. 1993. *Physiology of herbicide action*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Di Poi, C., Costil, K., Bouchart, V., & Halm-Lemeille, M.P. 2017. Toxicity assessment of five emerging pollutants, alone and in binary or ternary mixtures, towards three aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-13.

Duke, S.O., Cedergreen, N., Velini, E.D., & Belz, R.G. 2006. Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks on Pest Management*, 17(1): 29-33.

Dunn, O.J. 1964. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6: 241-252.

Edwards, W.M., Triplett, G.B. & Kramer, R.M. 1980. A watershed study of glyphosate transport in runoff. *Journal of Environmental Quality*, 9: 661-665.

Feng, J., Thompson, D. & Reynolds, P. 1990. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed.1. Aquatic residues and off-target deposit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 1110-1118.

Ferreira, D.F. 2000 Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. *Reunião Anual Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria*, São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 258p.

Forlani, G., Pavan, M., Gramek, M., Kafarski, P. & Lipok, J. 2008. Biochemical Bases for a Widespread Tolerance of Cyanobacteria to the Phosphonate Herbicide Glyphosate. *Plant and cell physiology*, 49(3): 443-456.

Ge, S., Madill, M. & Champagne, P. 2017. Use of freshwater macroalgae *Spirogyra* sp. for the treatment of municipal wastewaters and biomass production for biofuel applications. *Biomass and Bioenergy*, 1 - 11.

Geiger, D.R., Kapitan, S.W. & Tucci, M.A. 1986. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. *Plant Physiology*, 82(2): 468-472.

Geiger, D.R., Tucci, M.A. & Serviates, J.C. 1987. Glyphosate effects on carbon assimilation and gas exchange in sugar beet leaves. *Plant Physiology*, 85(2): 365-369.

Genty, B., Briantais, J.M. & Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990(1): 87-92.

Giesy, J.P., Dobson, S. & Solomon, K.R. 2000. *Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide*. Springer New York, 120p.

Gomes, M.P., Le Manac'h, S.G., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lucotte, M., & Juneau, P. 2017. Glyphosate-Dependent Inhibition of Photosynthesis in Willow. *Frontiers in plant science*, 8: 207.

Gomes, M.P., Le Manac'h, S.G., Maccario, S., Labrecque, M., Lucotte, M., & Juneau, P. 2016. Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. *Pesticide biochemistry and physiology*, 130: 65-70.

Gomes, M.P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M. & Juneau, P. 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of experimental botany*, 65(17): 4691-4703.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, (4).

Hanke, I., Wittmer, I., Bischofberger, S., Stamm, C., & Singer, H. 2010. Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. *Chemosphere*, 81(3): 422-429

Legris, J. & Couture, G. 1989. Residus de glyphosate dans l'eau et les sediments suite a des pulverisations terrestres en milieu forestier en 1986. Publication #3322. Gouvernement du Quebec, Ministere de l'Energie et des Ressources, Direction de la Conservation, Charlesbourg, Quebec, Canada.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Döll, M., Fietz, H. J., Bach, T., Kozel, U., Meier, D. & Rahmsdorf, U. 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis research*, 2(2): 115-141.

Lipok, J., Studnik, H. & Gruyaert, S. 2010. The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(7): 1681-1688.

Littler, M.M. & Arnold, K.E. 1985. Electrodes and chemicals. In: Little, M. M. & Little, D. S. (eds): *Handbook of phycological methods. Ecological field methods: Macroalgae*. Cambridge University Press, Cambridge. 349-375.

Magbanua, F.S., Townsend, C.R., Hageman, K.J., Piggott, J.J., & Matthaei, C.D. 2016. Individual and combined effects of fine sediment and glyphosate herbicide on invertebrate drift and insect emergence: a stream mesocosm experiment. *Freshwater Science*, 35(1): 139-151.

Mahler, B.J., Van Metre, P.C., Burley, T.E., Loftin, K.A., Meyer, M.T., & Nowell, L.H. 2017. Similarities and differences in occurrence and temporal fluctuations in glyphosate and atrazine in small Midwestern streams (USA) during the 2013 growing season. *Science of the Total Environment*, 579, 149-158.

Mantoan, L.P.B., de Almeida, L.F.R., Macedo, A.C., Ferreira, G. & Boaro, C.S.F. 2016. Photosynthetic adjustment after rehydration in *Annona emarginata*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(6): 1-11.

Ministério da Saúde (BR). 2011. Portaria no 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial União.

Necchi, O.Jr. 2004. Light-related photosynthetic characteristics of lotic macroalgae. *Hydrobiologia* 525: 139-155.

Necchi, O.Jr. 2005. Light-related photosynthetic characteristics of freshwater rhodophytes. *Aquatic Botany* 82: 193-209.

Necchi, O.Jr. & Zucchi, M.R. 2001. Photosynthetic performance of freshwater Rhodophyta in response to temperature, irradiance, pH and diurnal rhythm. *Phycological Research*, 49: 305-318.

Nešković N.K., Poleksić V., Elezović I., Karan V. & Budimir M. 1996. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 295-302.

Newton, M., Horner, L.H., Cowell, J.E., White, D.E. & Cole E. C. 1994. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American forests. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42: 1795-1802.

OECD. Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento. 2011. *Lemna* sp. *Teste de inibição do crescimento*. Diretriz 221. OECD, Paris.

Okada, H. & Watanabe, Y. 2002. Effect of physical factors on the distribution of filamentous green algae in the Tama River. *Limnology* 3:121-126.

Oliveira, R.C., Boas, L.K.V. & Branco, C.C.Z. 2016. Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae). *Phycologia*, 55(5): 577-584.

Oliveira, R.C., Tonetto, A.F., Peres, C.K. & Branco, C.C.Z. 2013. The influence of landscape on the spatial and temporal distribution of stream macroalgal communities of two types of subtropical biomes. *Limnetica*, 32(2): 287-302.

Pereira, J.L. & Branco, L.H.Z. 2007. Influência do nitrato e fosfato no crescimento de *Schizomeris leiblenii* Kützinger (Chaetophorales, Chlorophyta). *Acta Botanica Brasilica* 21(1): 155-162.

Peres, C.K., Tonetto, A.F., Garey, M.V. & Branco, C.C.Z. 2017. Canopy cover as the key factor for occurrence and species richness of subtropical stream green algae (Chlorophyta). *Aquatic Botany*, 137, 24-29.

Pérez, G.L., Torremorell, A., Mugni, H., Rodríguez, P., Vera, M.S., Nascimento, M.D., Allende, L., Bustingorry, J., Escaray, R., Ferraro, M., Izaguirre, I., Pizarro, H., Bonetto,

C., Morris, D.P. & Zagarese, H. 2007. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications*, 17(8): 2310-2322.

Pérez, G.L., Vera, M.S. & Miranda, M. 2011. Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems, *Herbicides and Environment*, Kortekamp, A. (ed.), ISBN: 978-953-307-476-4, disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-andenvironment/effects-of-herbicide-glyphosate-and-glyphosate-based-formulations-on-aquatic-ecosystems> (último acesso em: 02/05/2013 às 11:00)

Peruzzo, P.J., Porta, A.A. & Ronco, A.E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156: 61-66.

Pizarro, H., Vera, M.S., Vinocur, A., Pérez, G., Ferraro, M., Helman, R.M. & dos Santos Afonso, M. 2016. Glyphosate input modifies microbial community structure in clear and turbid freshwater systems. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(6): 5143-5153.

Poiger, T., Buerge, I.J., Bächli, A., Müller, M.D. & Balmer, M.E. 2017. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2): 1588-1596.

Reddy, K.N., Rimando, A.M. & Duke, S.O. 2004. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(16): 5139-5143.

Rodriguez-Gil, J.L., Prosser, R., Poirier, D., Lissemore, L., Thompson, D., Hanson, M. & Solomon, K.R. 2017. Aquatic hazard assessment of MON 0818, a commercial mixture of alkylamine ethoxylates commonly used in glyphosate-containing herbicide formulations. Part 1: Species sensitivity distribution from laboratory acute exposures. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(2): 501-511.

Ryan, B.F., Joiner, B.L. & Ryan, T.A., 1985. Minitab handbook. Duxbury Press, Boston, USA.

Sáenz, M.E. & Di Marzio, W.D. 2009. Ecotoxicidad del herbicida glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. *Limnetica*, 28(1): 149-158.

Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C. 1995. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. Em: Schulze, E.D. & Caldwell, M.M. (eds.): *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlim. 49-70.

- Scott, A.J. & Knott, M.A. 1974. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30: 507-12.
- Shea, P.J. & Tupy, D.R. 1984. Reversal of Cation-Induced Reduction in Glyphosate Activity by EDTA. *Weed science*, 32(6): 802-806.
- Sheath, R.G. & Burkholder, J. 1985. Characteristics of softwater stream in Rhode Island. II: Composition and seasonal dynamics of macroalgae communities. *Hydrobiologia* 128: 109-118.
- Shieh, W.J., Geiger, D.R. & Servantes, J.C. 1991. Effect of N-(Phosphonomethyl) glycine on carbon assimilation and metabolism during a simulated natural day. *Plant Physiology*, 97(3): 1109-1114.
- Silva M.D., Peralba M.C.R & Mattos M.L.T. 2003. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do Arroio Passo do Pilão. *Pesticidas* 13:19-28.
- Stevenson, R.J., Bothwell, M.L. & Lowe, R.L. 1996. *Algal ecology-freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, 150-181.
- Székács, I., Fejes, Á., Klátyik, S., Takács, E., Patkó, D., Pomóthy, J., Mörtl, M., Horváth, R., Madarász, E., Darvas B. & Székács, A. 2014. Environmental and Toxicological Impacts of Glyphosate with Its Formulating Adjuvant *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, 8(3): 213-218.
- Thomas, M.L.H. 1988. Photosynthesis and respiration of aquatic macro – flora using the light and dark bottle oxygen method and dissolved oxygen analyser. Em: Lobban, C. S.; Chapman, D. J. & Kremer, B. P. (eds.): *Experimental Phycology: A laboratory Manual*. Cambridge University Press, Cambridge. 64-77.
- Tsui, M.T. & Chu, L.M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7): 1189-1197.
- Vera, M.S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M.M., Juárez, A., Molina, M.C.R., Tell, G. & Pizarro, H. 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology*, 21: 1805-1816.
- Vera, M.S., Juárez, Á.B. & Pizarro, H.N. 2014. Comparative Effects of Technical-Grade and a Commercial Formulation of Glyphosate on the Pigment Content of Periphytic Algae. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 93(4): 399-404.
- Vieira, J.Jr. & Necchi, O.Jr. 2003. Photosynthetic characteristic of charophytes from tropical ecosystems. *Phycological Research*, 51: 51-60.

Vera, M.S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G.L., Rodriguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, C., Zagarese, H. & Pizarro, H. 2010. New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19: 710-719.

Villeneuve, A., Humbert, J. F., & Larroudé, S. 2011. *Herbicide contamination of freshwater ecosystems: impact on microbial communities*. INTECH Open Acesso: Publisher.

Vivancos, P.D., Driscoll, S.P., Bulman, C.A., Ying, L., Emami, K., Treumann, A., Mauve, C., Noctor, G. & Foyer, C.H. 2011. Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant physiology*, 157(1): 256-268.

Wang, N., Besser, J.M., Buckler, D.R., Honegger, J.L., Ingersoll, C.G., Johnson, B.T., Kurtzweil, M. L., MacGregor, J. & McKee, M. J. 2005. Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms. *Chemosphere*, 59(4): 545-551.

Watanabe, M.M. 2005. Freshwater Culture Media. In: Andersen, R. A. (ed.) *Algal Culture Techniques*. Elsevier, Amsterdam, 13-20.

Wetzel, R.G. & Likens, G.E. 2000. *Limnological Analyses*, 3rded. Springer. New York.

Yamada, T. & Castro, P.D.C. 2007. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. *Informações Agronômicas*, 119: 1-32.

Yannicari, M., Tambussi, E., Istilart, C. & Castro, A.M. 2012. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 210-217.

Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J. & Constantin, J. 2012. Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175(2): 319-330.

Tabela 1. Lista de espécies estudadas com indicação da localização e classe de sombreamento dos ambientes lóticos (DeNicola *et al.* 1992) onde foram coletados.

Espécimes	Localização	Classe de Sombreamento
<i>Oedogonium</i> sp.	Rio do Pari (Platina/SP) 22°40'11'' S - 50°28'59'' O	Aberto
<i>Nitella subglomerata</i> A. Braun	Rio Cubatão (Cajuru/SP) 21°14'14'' S - 47°13'15'' O	Parcialmente Sombreado
<i>Spirogyra</i> sp.	Ribeirão Pirapitininga (Assis/SP) 22°38'28'' S - 50°20'28'' O	Aberto
<i>Desmidium grevillei</i> (Kützinger ex Ralfs) De Bary	Ribeirão das Antas (Assis/SP) 22°34'28,2" S - 50°25'6,9" O	Parcialmente Sombreado

Tabela 2. Taxas de fotossíntese líquida (mg de O₂.g⁻¹ de PS.h⁻¹), respiração no escuro (mg de O₂.g⁻¹ de PS.h⁻¹) e concentração de clorofila *a* (µg.mg⁻¹ de PS) em termos de média e desvio padrão das espécies de macroalgas expostas a diferentes concentrações (Controle; 0,28; 3,5; e 6 mg L⁻¹) de glifosato grau técnico. Fotos.: taxa de fotossíntese líquida; Resp.: taxa de respiração no escuro; Clor.: concentração de clorofila *a*.

		1º dia (T1)			7º dia (T7)		
		Fotos.	Resp.	Clor.	Fotos.	Resp.	Clor.
<i>Oedogonium</i> sp.	0	2,3±0,8a	0,7±0,4a	6,4±1,7b	4,8±1,7a	2,3±1,8a	4,0±1,3a
	0,28	2,3±1,2a	1,5±0,7a	4,6±1,1a	5,6±2,4a	2,1±1,2a	3,9±0,8a
	3,5	3,9±0,1b	1,4±0,1a	4,7±0,9a	7,8±2,2a	3,0±1,1a	3,8±0,6a
	6	4,1±0,4b	7,3±2,1b	4,1±1,0a	6,4±0,9a	17,3±2,2b	4,2±1,2a
<i>Nitella subglomerata</i>	0	11,5±1,5a	3,7±1,2a	3,0±0,7a	7,9±2,4a	5,9±1,9a	1,0±0,3a
	0,28	15,2±4,0a	2,1±1,8a	2,5±0,5a	6,4±1,0a	7,9±3,3a	1,3±0,6a
	3,5	15,5±0,6a	10,1±3,2b	2,7±0,9a	5,3±1,4a	10,1±0,9a	2,3±1,0b
	6	13,5±0,7a	8,3±1,4b	2,5±0,8a	6,3±1,9a	7,2±2,1a	1,1±0,6a
<i>Spirogyra</i> sp.	0	29,8±5,4a	35,9±20,9a	11,2±3,1b	20,5±9,7ab	140,0±23,7a	6,1±3,4a
	0,28	28,6±5,6a	11,8±4,4a	7,7±3,7a	8,0±5,7a	86,0±16,9a	3,2±1,9a
	3,5	43,4±10,8a	11,4±1,5a	6,9±4,0a	29,7±12,7b	126,7±49,4a	3,1±1,7a
	6	35,4±7,7a	1,8±1,7a	5,4±1,3a	34,5±4,5b	160,3±77,3a	2,8±1,2a
<i>Desmidium grevillei</i>	0	22,2±6,7b	34,1±7,3a	2,1±1,0a	34,6±10,4b	35,3±8,8a	4,5±0,9b
	0,28	20,5±10,1b	33,4±11,3a	1,7±0,4a	41,0±10b	30,8±7,4a	3,9±2,0b
	3,5	15,5±8,2b	38,1±9,4a	4,9±2,7b	27,6±4,9a	45,4±12,3a	1,8±0,7a
	6	7,4±4,4a	27,8±5,1a	3,8±2,4b	20,7±3,8a	61,3±19,7a	4,2±1,5b

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Análise de variância multivariada (MANOVA), considerando a taxa de fotossíntese líquida (Fotos.), a taxa de respiração no escuro (Resp.) e concentração de clorofila *a* (Clor.) como variáveis dependentes e o tempo de exposição, e o tratamento com glifosato grau técnico como covariáveis.

		Fotos.		Resp.		Clor.	
		F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
<i>Oedogonium</i> sp.	Tempo	19,2	<0,01	4,49	<0,05	15,4	<0,01
	Tratamento	3,95	<0,05	10,6	<0,01	8,88	<0,01
	Interação	0,02	0,88	1,85	0,17	5,35	<0,05
<i>Nitella subglomerata</i>	Tempo	36,54	<0,01	6,57	<0,05	26,04	<0,01
	Tratamento	1,19	0,28	11,43	<0,01	1,37	0,24
	Interação	1,75	0,19	4,17	<0,05	1,74	0,19
<i>Spirogyra</i> sp.	Tempo	15,39	<0,01	60,18	<0,01	32,28	<0,01
	Tratamento	8,91	<0,01	1,62	0,22	7,87	<0,01
	Interação	6,45	<0,01	1,16	0,35	0,57	0,63
<i>Desmidium grevillei</i>	Tempo	35,08	<0,01	4,75	<0,05	1,22	0,27
	Tratamento	9,3	<0,01	1,68	0,21	1,41	0,24
	Interação	0,65	0,58	3,27	<0,05	8,9	<0,01

Tabela 4. Análise de variância multivariada (MANOVA), considerando o rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}), o “quenching” fotoquímico (qP), a dissipação de calor no complexo antena (D) e a dissipação de calor no centro de reação (E) como variáveis dependentes e o tempo de exposição e o tratamento com glifosato grau técnico como covariáveis.

		Φ_{PSII}		qP		D		E	
		F	P	F	p	F	p	F	p
<i>Oedogonium</i> sp.	Tempo	151,14	<0,01	92,05	<0,01	89,47	<0,01	55,2	<0,01
	Tratamento	34,4	<0,01	16,87	<0,01	35,97	<0,01	7,92	<0,01
	Interação	3,05	<0,05	0,24	0,86	3,55	<0,05	0,83	0,48
<i>Nitella subglomerata</i> *	Tempo	113,99	<0,01	105,33	<0,01	0,6	0,39	53,19	<0,01
	Tratamento	71,93	<0,01	10,23	<0,01	17,52	<0,01	0,3	0,67
	Interação	17,33	<0,01	-5,33	1	-3,92	0,79	-5,66	1
<i>Spirogyra</i> sp.	Tempo	704,55	<0,01	307,79	<0,01	14,55	<0,01	33,08	<0,01
	Tratamento	1,5	0,23	3,86	<0,05	7,22	<0,01	8,24	<0,01
	Interação	1,03	0,39	0,51	0,67	0,64	0,59	0,43	0,73
<i>Desmidium grevillei</i>	Tempo	6,21	<0,05	0,63	0,43	14,64	<0,01	6,15	<0,05
	Tratamento	1,08	0,37	2,19	0,1	3,02	<0,05	1,72	0,18
	Interação	0,23	0,87	0,43	0,72	0,11	0,95	0,2	0,89

* Para dados não paramétricos foi realizada a Análise de variância PERMANOVA

Tabela 5. Taxas de fotossíntese líquida (mg de O₂.g⁻¹ de PS.h⁻¹), respiração no escuro (mg de O₂.g⁻¹ de PS.h⁻¹) e concentração de clorofila *a* (µg.mg⁻¹ de PS) em termos de média e desvio padrão das espécies de macroalgas expostas a diferentes concentrações (Controle; 0.28; 3.5; e 6 mg i.a.L⁻¹) de Roundup®. Fotos.: taxa de fotossíntese líquida; Resp.: taxa de respiração no escuro; Clor.: teor de clorofila *a*.

		1º dia (T1)			7º dia (T7)		
		Fotos.	Resp.	Clor.	Fotos.	Resp.	Clor.
<i>Oedogonium</i> sp.	0	4,5±0,9a	11,3±0,6b	3,7±1,1a	6,8±1,7a	5,6±0,9a	1,4±0,7a
	0,28	4,1±1,2a	4,1±0,4a	3,2± 1,1a	10,8±3,3b	9,8±4,7a	1,9±1,0a
	3,5	6,1±1,5a	3,5±0,3a	2,5±1,8a	4,8±1,3a	19,1±4,2b	1,9±1,1a
	6	5,1±0,8a	3,2±0,7a	3,4±1,0a	6,1±2,7a	19,1±4,7b	1,4±0,7a
<i>Nitella</i> <i>subglomerata</i>	0	22,5±5,6b	8,0±1,5a	9,4±3,6a	26,9±5,8b	37,7±16,7b	11,2±6,0b
	0,28	11,72±1,1a	8,5±3,3a	10,6±3,3a	25,0±4,2b	9,5±5,3a	7,0±2,8a
	3,5	13,2±3,6a	9,3±2,3a	10,4±2,0a	15,5±3,2a	10,5±0,2a	5,1±0,8a
	6	13,5±4,3a	4,4±0,1a	7,1±2,0a	12,6±4,6a	8,3±2,1a	5,0±1,0a
<i>Spirogyra</i> sp.	0	76,5±10,4b	35,4±15,1a	8,0±3,2b	60,1±24,7b	86,6±20,4b	7,8±3,6b
	0,28	76,7±11,0b	24,5±6,1a	6,0±2,5b	60,5±16,7b	33,2±6,5a	2,6±0,8a
	3,5	74,6±15,8b	22,9±5,4a	4,0±1,6a	31,5±4,0a	28,1±2,0a	1,0±0,8a
	6	45,5±2,2a	13,4±5,1a	3,7±1,8a	27,5±4,9a	36,4±13,9a	0,6±0,3a
<i>Desmidium</i> <i>grevillei</i>	0	20,7±4,7b	43,1±10,7a	4,8±1,8a	38,1±8,1a	92,3±27,1b	5,7±2,1b
	0,28	9,4±1,7a	32,4±5,5a	3,8±0,8a	36,4±8,6a	37,2±4,3a	5,5±1,4b
	3,5	12,9±3,0a	32,4±15,3a	4,2±1,3a	24,1±3,9a	71,4±10,7b	2,6±0,9a
	6	11,5±1,5a	32,2±3,5a	3,6±1,5a	35,6±19,9a	56,7±8,1a	3,1±1,5a

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$).

Tabela 6. Análise de variância multivariada (MANOVA), considerando a taxa de fotossíntese líquida (Fotos.), a taxa de respiração no escuro (Resp.) e concentração de clorofila *a* (Clor.) como variáveis dependentes e o tempo de exposição e o tratamento de Roundup® como covariáveis.

		Fotos.		Resp.		Clor.	
		F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
<i>Oedogonium</i> sp.	Tempo	17,36	<0,01	0,04	0,84	38,96	<0,01
	Tratamento	2,33	0,13	7,22	<0,05	0,09	0,96
	Interação	6,95	<0,05	24,31	<0,01	0,67	0,57
<i>Nitella subglomerata</i>	Tempo	11,24	<0,01	3,01	0,07	2,38	0,12
	Tratamento	1,86	0,18	1,35	0,24	1,08	0,3
	Interação	4,76	<0,05	-2,11	0,72	2,12	0,15
<i>Spirogyra</i> sp.	Tempo	30,77	<0,01	21,89	<0,01	50,43	<0,01
	Tratamento	13,11	<0,01	13,47	<0,01	24,95	<0,01
	Interação	2,43	0,08	4,71	<0,05	6,98	<0,01
<i>Desmidium grevillei</i>	Tempo	44,1	<0,01	31,07	<0,01	0,08	0,77
	Tratamento	2,18	0,07	6,94	<0,01	6,22	<0,01
	Interação	-0,65	0,09	3,34	<0,05	3,7	<0,05

Tabela 7. Análise de variância multivariada (MANOVA), considerando o rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}), o “quenching” fotoquímico (qP), a dissipação de calor no complexo antena (D) e a dissipação de calor no centro de reação (E) como variáveis dependentes e o tempo de exposição e o tratamento com Roundup® como covariáveis.

		Φ_{PSII}		qP		D		E	
		F	p	F	p	F	p	F	p
<i>Oedogonium sp.</i>	Tempo	480,8	<0,01	223,18	<0,01	213,32	<0,01	81,37	<0,01
	Tratamento	1,47	0,24	2,11	0,11	1,38	0,26	2,32	0,09
	Interação	6,02	<0,01	4,13	<0,05	1,08	0,36	3	<0,05
<i>Nitella subglomerata</i>	Tempo	7,94	<0,01	11	<0,01	2,66	0,11	12,91	<0,01
	Tratamento	4,45	<0,01	5,32	<0,01	2,76	<0,05	6,28	<0,01
	Interação	1,67	0,19	2,77	<0,05	4,14	<0,05	4,3	<0,05
<i>Spirogyra sp.</i>	Tempo	57,62	<0,01	29,57	<0,01	14,64	<0,01	1,92	0,17
	Tratamento	0,14	0,93	0,37	0,77	0,24	0,86	0,3	0,82
	Interação	2	0,133	2,59	0,07	0,74	0,53	2,41	0,08
<i>Desmidium grevillei</i>	Tempo	34,3	<0,01	31,68	<0,01	28,99	<0,01	2,7	0,11
	Tratamento	3,5	<0,05	3,85	<0,05	5,54	<0,01	9,22	<0,01
	Interação	0,03	0,99	0,15	0,92	0,02	0,99	0,08	0,96

Tabela 8. Taxas de fotossíntese líquida (mg de O₂.g⁻¹ de PS.h⁻¹), respiração no escuro (mg de O₂.g⁻¹ de PS.h⁻¹) e concentração de clorofila *a* (µg.mg⁻¹ de PS) em termos de média e desvio padrão das espécies de macroalgas expostas a diferentes concentrações (Controle; e 0,03 mg L⁻¹) de AMPA. Fotos.: taxa de fotossíntese líquida; Resp.: taxa de respiração no escuro; Clor.: concentração de clorofila *a*.

		1º dia (T1)			7º dia (T7)		
		Fotos.	Resp.	Clor.	Fotos.	Resp.	Clor.
<i>Oedogonium</i> sp.	0	5,5±1,0b	12,0±0,2b	2,6±0,4a	24,3±1,0b	6,1±2,0a	1,0±0,3a
	0,03	4,3±0,5a	4,1±0,4a	2,7±0,7a	16,2±4,1a	3,1±1,6a	1,3±0,6a
<i>Nitella subglomerata</i>	0	5,4±2,2a	10,5±2,4a	6,4±1,1b	2,9±0,8a	10,3±2,7a	2,7±0,8a
	0,03	4,5±2,0a	10,7±1,1a	5,1± 0,6a	2,5±0,1a	6,3±3,5a	2,5±0,5a
<i>Spirogyra</i> sp.	0	14,7±1,2a	65,8±5,0a	4,8±2,5a	24,5±12,2b	116,0±32,3a	4,0±2,1b
	0,03	12,1±2,4a	54,4±7,7a	5,8±2,1a	4,6±1,5a	47,1±11,5a	1,8±1,3a
<i>Desmidium grevillei</i>	0	26,0±6,9a	58,0±7,6a	4,2±1,4a	26,8±10,9a	22,7±8,0a	1,5±0,9a
	0,03	31,2±8,0a	48,9±23,2a	3,6±1,0a	23,0±1,8a	7,1±1,9a	1,5±0,8a

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$).

Tabela 9. Análise de variância multivariada (MANOVA) considerando a taxa de fotossíntese líquida (Fotos.), a taxa de respiração no escuro (Resp.) e concentração de clorofila *a* (Clor.) como variáveis dependentes e o tempo de exposição e o tratamento com AMPA como covariáveis.

		Fotos.		Resp.		Clor.	
		F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
<i>Oedogonium</i> sp.	Tempo	164,9	<0,01	21,1	<0,01	24,2	<0,01
	Tratamento	0	1	30,5	<0,01	0,46	0,5
	Interação	11,3	<0,01	8,13	<0,05	0,88	0,35
<i>Nitella subglomerata</i>	Tempo	6,57	<0,01	0,08	0,77	79	<0,01
	Tratamento	0,71	0,4	1	0,34	8,82	<0,01
	Interação	0,06	0,79	2,31	0,16	3,39	0,07
<i>Spirogyra</i> sp.	Tempo	3,13	0,09	4,35	0,07	9,69	<0,01
	Tratamento	24,3	<0,01	15,27	<0,01	0,68	0,41
	Interação	14,2	<0,01	7,82	<0,05	4,72	<0,05
<i>Desmidium grevillei</i>	Tempo	1,18	0,29	26,73	<0,01	0,72	0,4
	Tratamento	0,03	0,85	2,75	0,13	39,82	<0,01
	Interação	1,76	0,2	0,18	0,67	0,81	0,37

Tabela 10. Análise de variância multivariada (MANOVA), considerando o rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}), o “quenching” fotoquímico (qP), a dissipação de calor no complexo antena (D) e a dissipação de calor no centro de reação (E) como variáveis dependentes e o tempo de exposição e o tratamento com AMPA como covariáveis.

		Φ_{PSII}		qP		D		E	
		F	p	F	P	F	p	F	p
<i>Oedogonium</i> sp.	Tempo	9,1	<0,01	52,2	<0,01	22,5	<0,01	55,3	<0,01
	Tratamento	5,22	<0,05	1,88	0,18	1,16	0,29	0,01	0,94
	Interação	0,01	0,95	0,02	0,87	0,01	0,94	0,01	0,9
<i>Nitella subglomerata</i>	Tempo	6,57	0,02	0,08	0,77	79	<0,01	79	<0,01
	Tratamento	0,71	0,4	1	0,34	8,82	<0,01	8,82	<0,01
	Interação	0,06	0,79	2,31	0,16	3,39	0,07	3,39	0,07
<i>Spirogyra</i> sp.	Tempo	323,2	<0,01	108,2	<0,01	264,74	<0,01	20,03	<0,01
	Tratamento	5,74	<0,05	16,51	<0,01	12,45	<0,01	27,66	<0,01
	Interação	28,93	<0,01	22,09	<0,01	0,97	0,33	7,18	<0,05
<i>Desmidium grevillei</i>	Tempo	12,01	<0,01	9,84	<0,01	14,39	<0,01	3,52	0,07
	Tratamento	3,01	0,1	2,72	0,11	3,08	0,09	0,47	0,5
	Interação	1,75	0,2	2,62	0,12	0,43	0,51	0,51	0,48

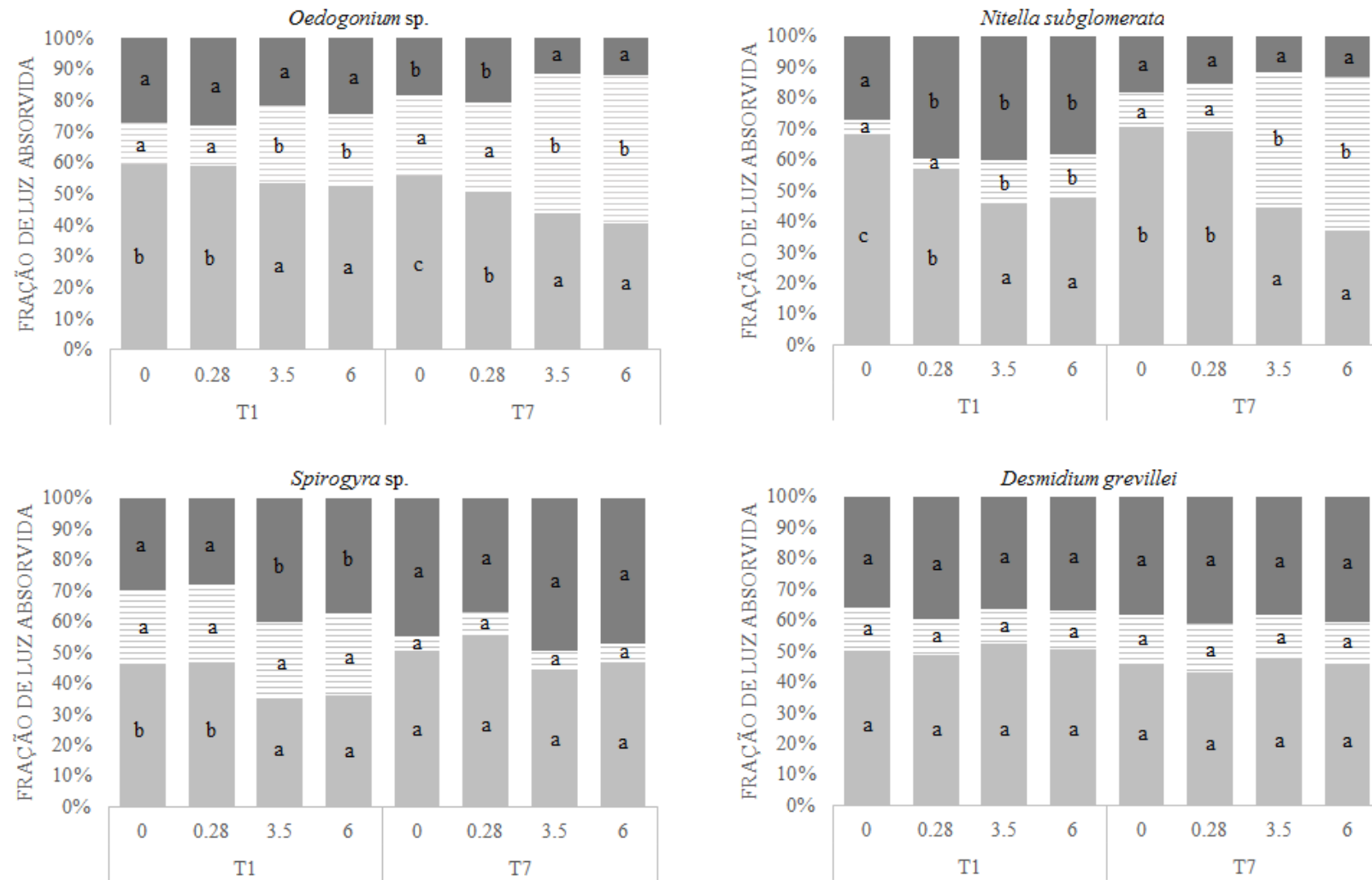


Figura 1. Percentual da fração de luz usado pelas macroalgas na fotossíntese (rendimento quântico efetivo - Φ_{PSII} - listrado) e dissipado na forma de calor pelo complexo antena (D – cinza claro) e pelo centro de reação (E – cinza escuro) quando expostas ao glifosato grau técnico. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$).

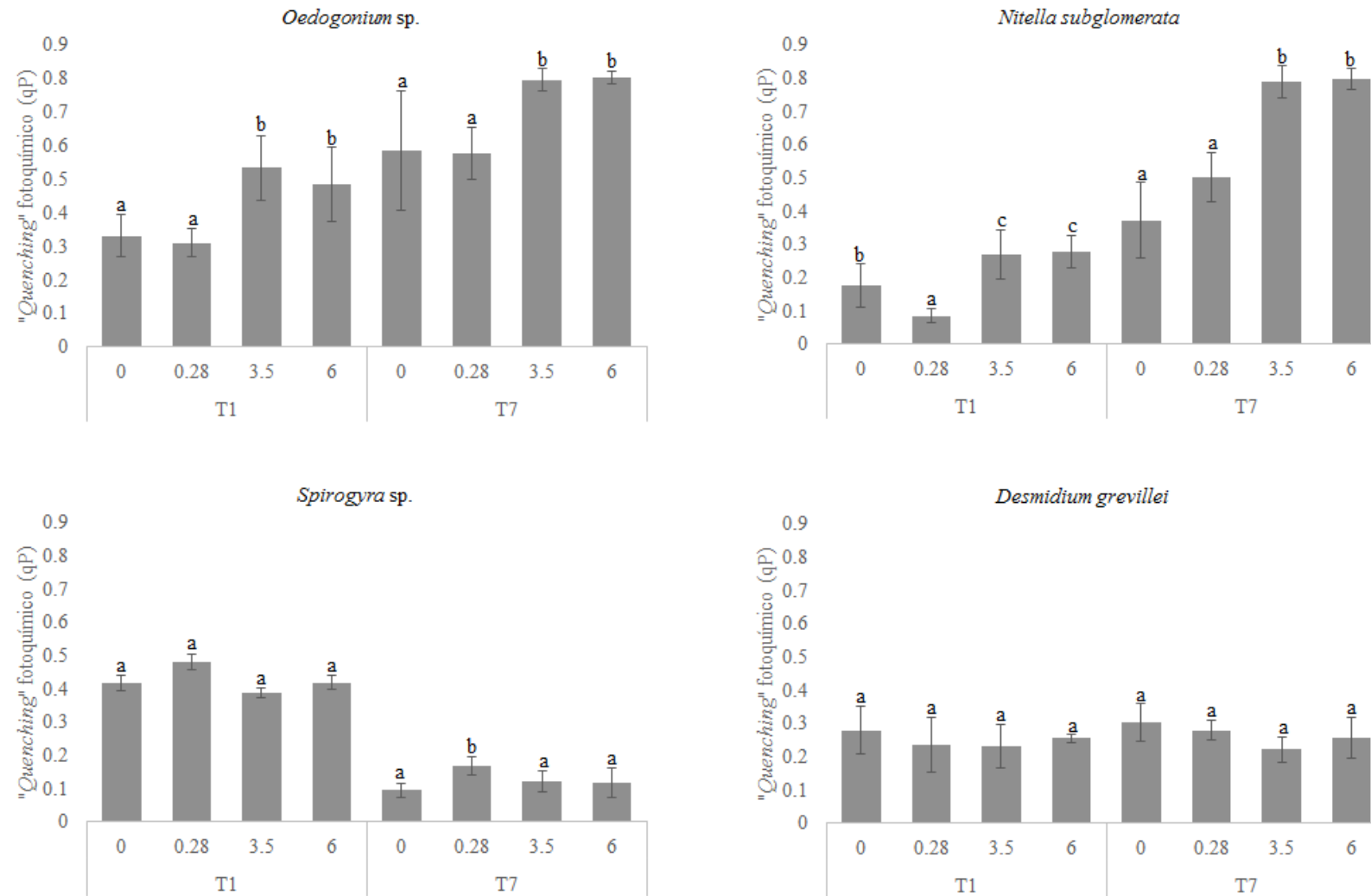


Figura 2. “Quenching” fotoquímico (qP) das espécies de macroalgas analisadas após um (T1) e setes dias (T7) de exposição ao glifosato grau técnico. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$).

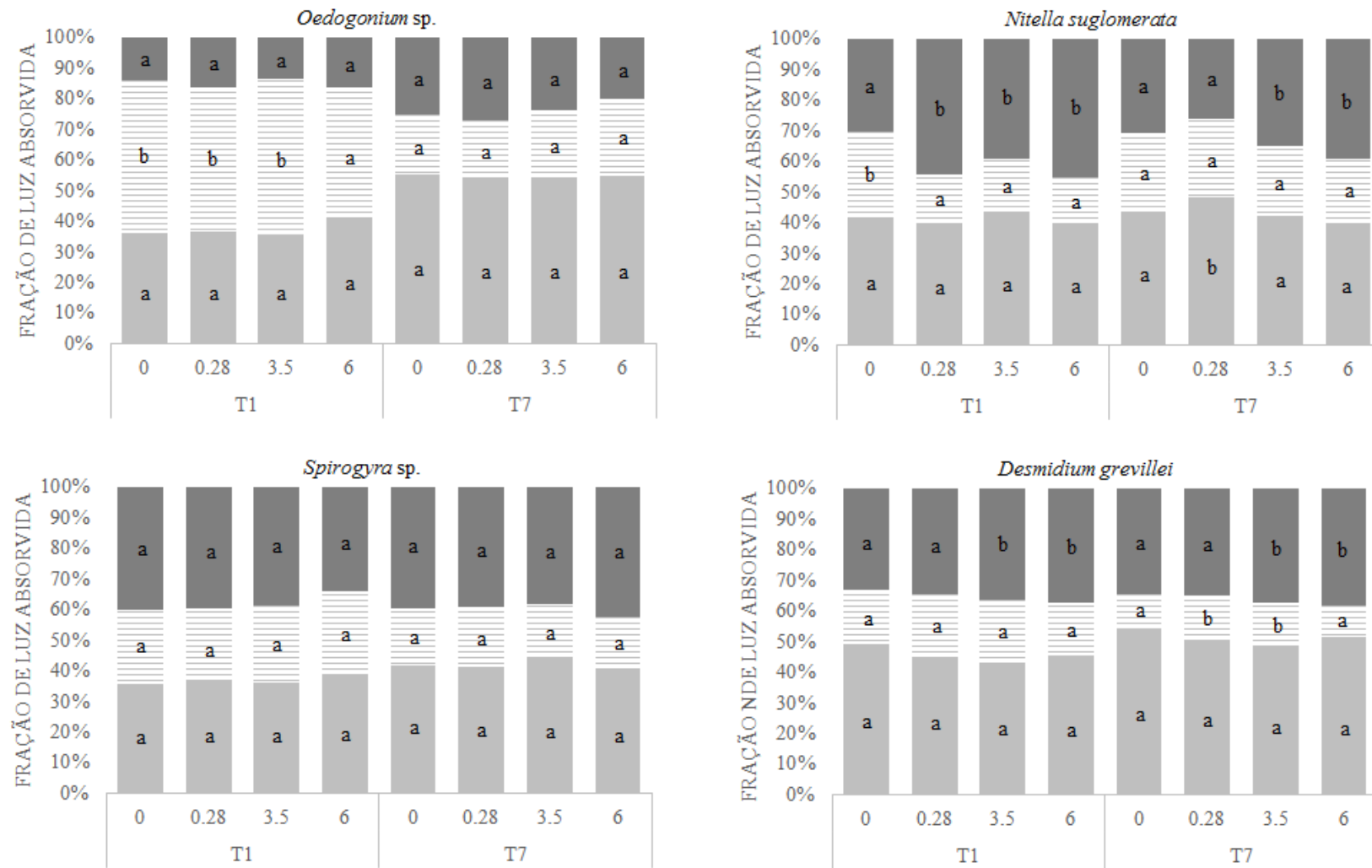


Figura 3. Percentual da fração de luz usado pelas macroalgas na fotossíntese (rendimento quântico efetivo - Φ_{PSII} - listrado) e dissipado na forma de calor pelo complexo antena (D – cinza claro) e pelo centro de reação (E – cinza escuro) quando expostas ao Roundup®. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$).

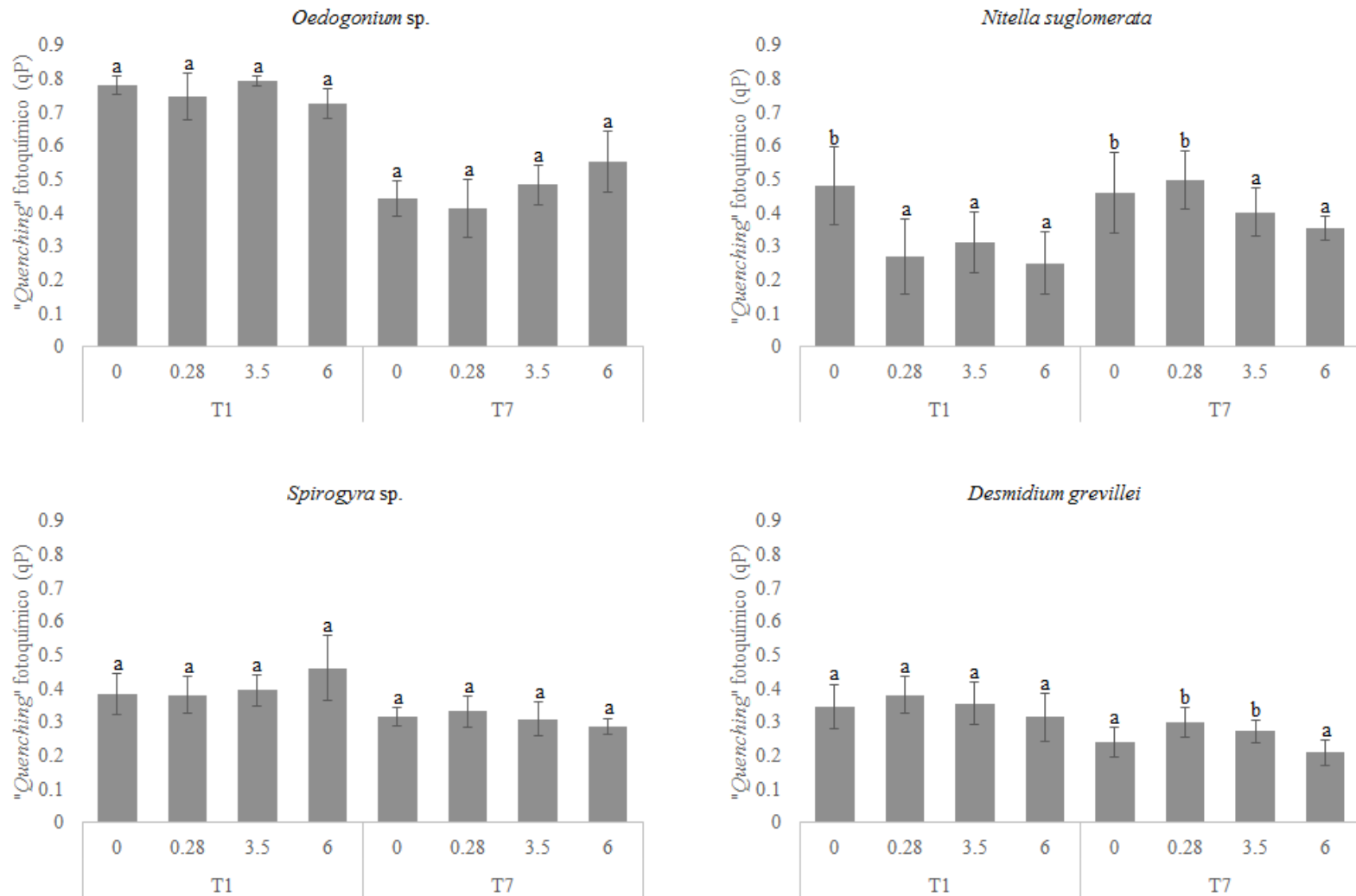


Figura 4. “Quenching” fotoquímico (qP) das espécies de macroalgas analisadas após um (T1) e setes dias (T7) de exposição ao Roundup®. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$).

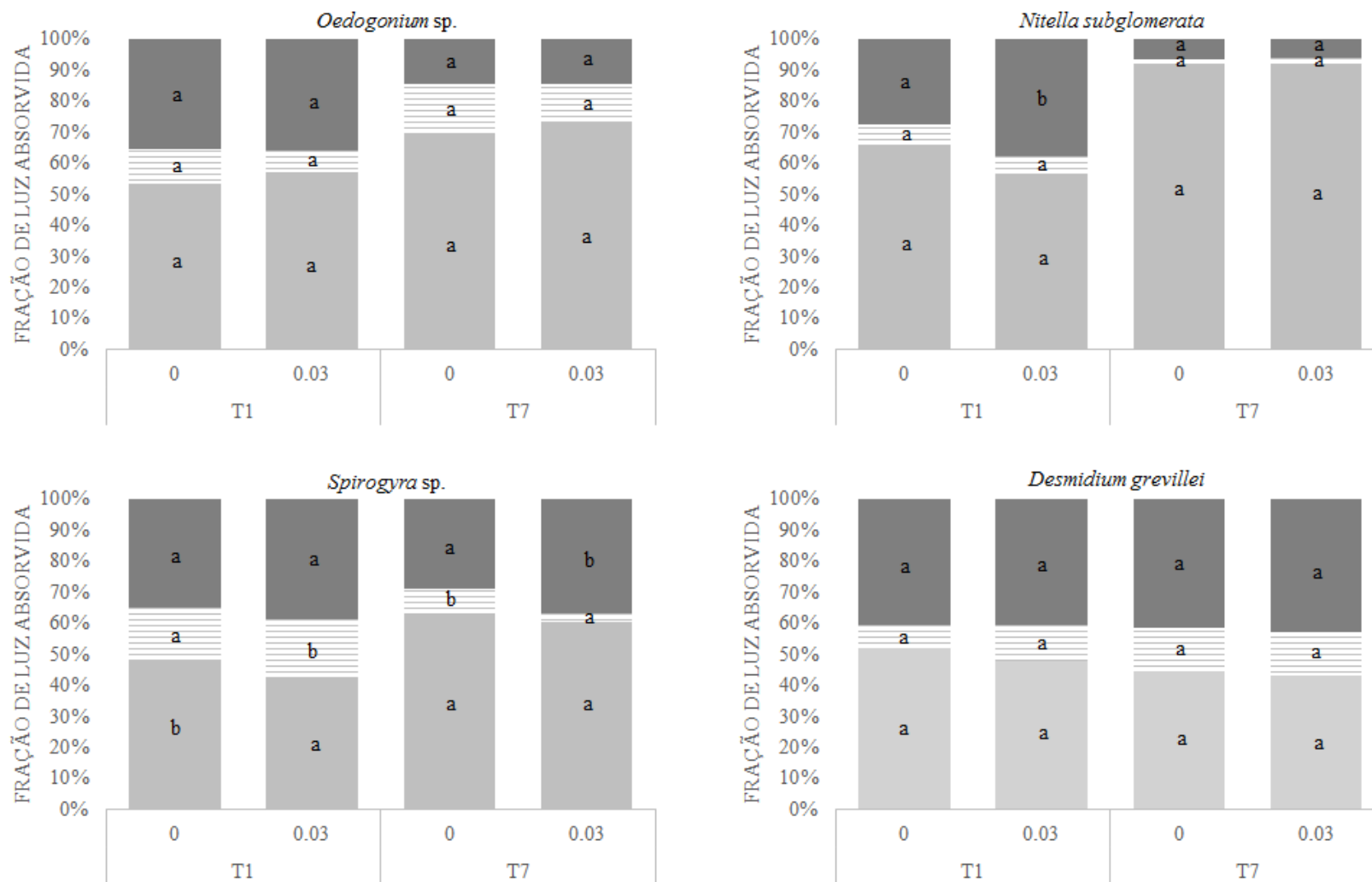


Figura 5 Percentual da fração de luz usado pelas macroalgas na fotossíntese (rendimento quântico efetivo - Φ_{PSII} - listrado), e dissipado na forma de calor pelo complexo antena (D – cinza claro) e pelo centro de reação (E – cinza escuro) quando expostas ao AMPA. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$).

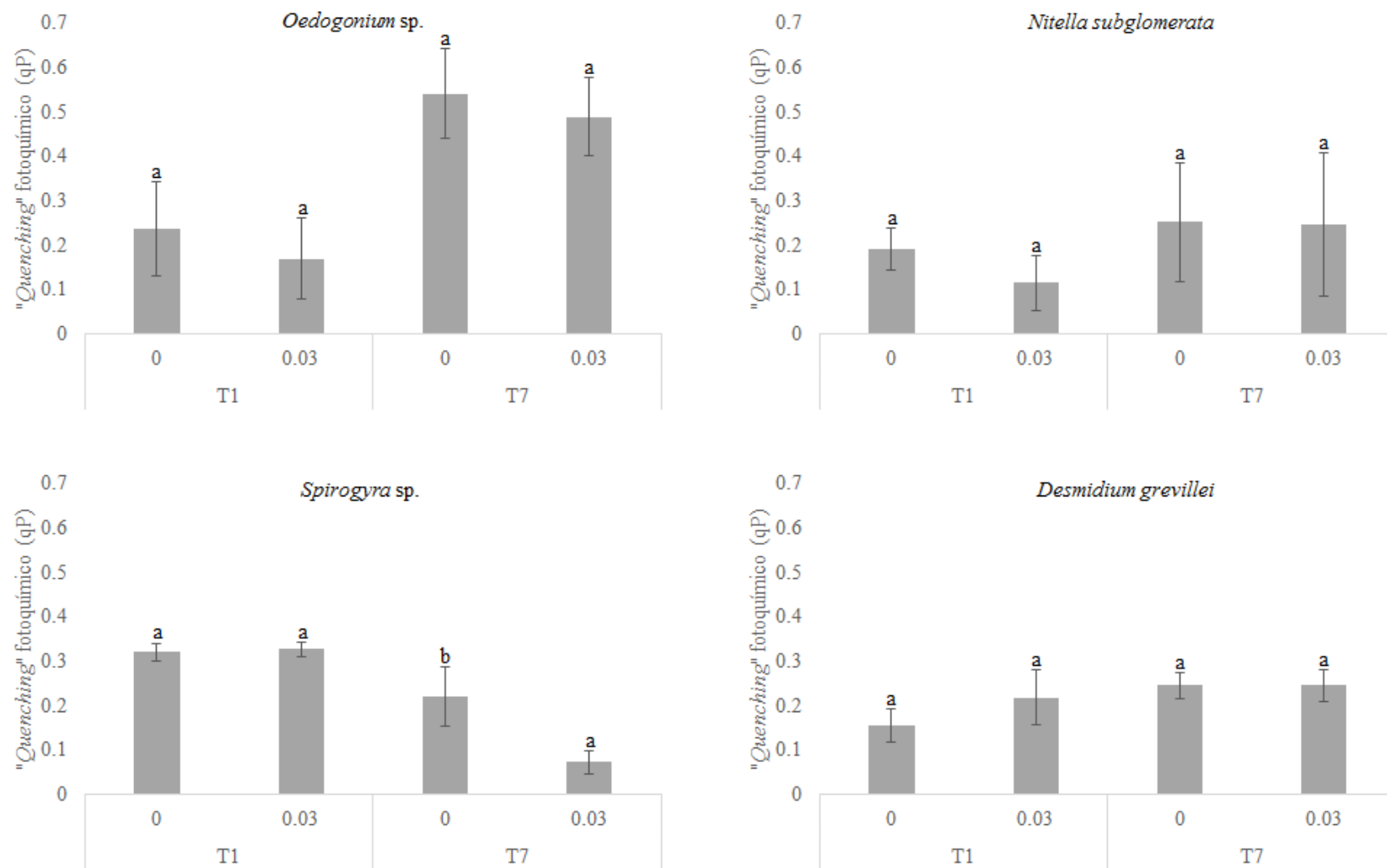


Figura 6. "Quenching" fotoquímico (qP) das espécies de macroalgas analisadas após um (T1) e setes dias (T7) de exposição ao AMPA. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$).

Capítulo 3

Efeito da combinação de herbicidas a base de glifosato e 2,4-D sobre as respostas fotossintéticas de macroalgas verdes de ambientes lóticos tropicais.

Régis de Campos Oliveira & Ciro Cesar Zanini Branco

Laboratório de Biologia Aquática, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências e Letras,
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP,
Assis, SP, Brasil

Artigo em preparação para submissão na revista *Journal of Applied Phycology*.

Resumo

O aumento do número de plantas daninhas resistentes ao glifosato em áreas de cultivo têm levado os produtores rurais a buscarem formas alternativas para o manejo dessas plantas. Uma alternativa bastante difundida neste contexto consiste na aplicação conjunta de herbicidas à base de glifosato e 2,4-D. E, ainda que ambos os herbicidas figurem entre os mais utilizados no Brasil, estudos que avaliam as consequências da contaminação simultânea por estes herbicidas em ambientes aquáticos, principalmente sobre os produtores primários, são escassos. Para preencher esta lacuna, este trabalho buscou avaliar a resposta fotossintética de quatro espécies de macroalgas verdes (*Nitella subglomerata*, *Oedogonium* sp., *Spirogyra* sp., e *Desmidium grevillei*), através do método da evolução do oxigênio dissolvido, da fluorescência da clorofila *a* e da concentração de clorofila *a*, quando expostas a uma combinação de glifosato (Roundup® - 3,5 mg a.e.L⁻¹) e 2,4-D (Bratt® - 2 mg a.e.L⁻¹), após um e sete dias de exposição. Os resultados mostraram que os efeitos negativos sobre as respostas fotossintéticas das macroalgas analisadas tenderam a serem amenizados ao longo do tempo, não sendo mais estatisticamente perceptíveis após sete dias de exposição. De modo geral, ao comparar os resultados relativos à exposição das macroalgas à mistura de herbicidas com aqueles obtidos após a exposição dos herbicidas individualmente, há indícios indicando que o 2,4-D seja capaz de gerar efeitos antagônicos ao glifosato para a maioria das espécies testadas.

Palavras-chave: glifosato, 2,4-D, mistura de herbicidas, fluorescência da clorofila *a*, resposta fotossintética, macroalgas verdes.

Introdução

O glifosato, N-(fosfonometil) glicina, é um herbicida cujo principal mecanismo de ação reside na inibição da enzima EPSPs (5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase), responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos fundamentais para o desenvolvimento da planta (Devine *et al.*, 1993; Forlani *et al.*, 2008; Sáenz & Di Marzio, 2009). A interrupção na atividade da enzima EPSPs pelo glifosato gera também efeitos indiretos na fotossíntese através da redução na concentração de carotenoides, clorofila *a*, ácidos graxos e na assimilação de carbono (Yamada & Castro, 2007; Zobiole *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2014; 2017). Adicionalmente, a capacidade de formação de centros de reação do fotossistema II (PSII) também é afetada pela inibição da síntese de aminoácidos aromáticos (Vivancos *et al.*, 2011; Yanniccari *et al.*, 2012).

Atualmente, o glifosato é um dos herbicidas mais utilizados no mundo (Annett *et al.*, 2014; Battaglin *et al.*, 2014; Poiger *et al.*, 2017). No entanto, sua extensiva utilização durante as últimas décadas gerou uma pressão seletiva sobre as plantas daninhas ocasionando a seleção de biótipos resistentes (Christoffoleti, 2001). Embora o número de biótipos resistentes venha aumentando a cada ano, a utilização de herbicidas a base de glifosato continua sendo uma opção, porém, associada a certas adaptações neste tipo de manejo agrícola que passaram a ser utilizadas (Christoffoleti & López-Ovejero, 2008; Pérez *et al.*, 2011; Christoffoleti & Nicolai, 2016). Neste sentido, para controlar uma população de plantas daninhas resistentes ao glifosato presentes em áreas de cultivo, uma das medidas mais utilizadas por produtores rurais passou a ser a aplicação conjunta de glifosato com outro herbicida de mecanismo de ação distinto (Christoffoleti & López-Ovejero, 2008; Ulguim *et al.*, 2013; Christoffoleti & Nicolai, 2016).

Exemplos de herbicidas que têm sido utilizados em consórcio com o glifosato são os mimetizadores de auxinas, como o ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) que pode compor uma mistura com o glifosato em aplicações de dessecação no período de pré-plantio (Moreira *et al.* 2007; Takano *et al.*, 2013; Peterson *et al.*, 2016). O 2,4-D é utilizado em dicotiledôneas, gerando profundas alterações na organização do citoesqueleto das células vegetais, ocasionando, inicialmente, anomalias de crescimento e uma redução de atividade da mitocôndria e dos lisossomos, e, posteriormente, o aumento na concentração de ácido abscísico e etileno (Christoffoleti & López-Ovejero, 2008; Grossmann, 2010). O aumento na concentração de ácido abscísico provoca uma redução na assimilação de CO₂, ocasionado pelo fechamento estomático e culminando na redução da produtividade fotossintética. Adicionalmente, a produção desregulada de ácido abscísico e etileno pelo herbicida 2,4-D, gera um aumento no número de espécies reativas de oxigênio, que acarreta a degradação de

membranas lipídicas presentes em organelas, como por exemplo cloroplastos, tendo como consequência até mesmo a morte celular. (Christoffoleti & López-Ovejero, 2008; Grossmann, 2010; Christoffoleti & Nicolai, 2016).

A consorciação de herbicidas a base de 2,4-D e glifosato tem obtido tão bons rendimentos no controle de vários biótipos resistentes ao glifosato que uma formulação comercial (contendo 195 g a.e.L⁻¹ de 2,4-D + 205 g a.e.L⁻¹ de glifosato) foi desenvolvida pela Dow AgroSciences (Li *et al.*, 2010; 2013; Peterson *et al.*, 2016).

Ainda que herbicidas à base de 2,4-D sejam vendidos em grandes quantidades no Brasil (IBAMA, 2016), problemas decorrentes do extenso carreamento desses herbicidas, fenômeno chamado de deriva, para outras áreas de cultivo não-alvo da aplicação original, levou os órgãos competentes a restringirem seu modo de aplicação e até mesmo sua utilização em alguns países (Sciumbato *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2016). Entre os ambientes mais suscetíveis à deriva indesejada de herbicidas estão os ambientes aquáticos, de modo que eventos de contaminação, não apenas relacionado ao carreamento do 2,4-D (Råberg *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2017), mas também ao glifosato (Battaglin *et al.*, 2014; Poiger *et al.*, 2017) são frequentemente reportados. Ao atingir o ambiente aquático, a complexa interação entre os diversos organismos presentes pode ser duramente afetada, ocasionando um desequilíbrio nestes ecossistemas (Botelho *et al.*, 2012). Pela semelhança fisiológica com as plantas daninhas, a comunidade de produtores primários dos ecossistemas aquáticos tende a ser afetada primariamente, produzindo não apenas um impacto sobre si mesma, mas, eventualmente, o transferindo para toda a teia trófica, em um efeito cascata.

Em ambientes lóticos, as macroalgas representam uma importante comunidade de produtores primários (Arscott *et al.*, 1998). As macroalgas verdes, por sua vez, são comumente reportados como aquelas que apresentam a maior riqueza e abundância nesses ambientes, principalmente em riachos submetidos a altas irradiâncias (Sheath & Burkholder 1985, Stevenson, 1996; Okada & Watanabe, 2002; Necchi, 2004; Peres *et al.*, 2017).

Embora existam trabalhos que já avaliaram os efeitos individuais do glifosato (Forlani *et al.*, 2008; Daouk *et al.*, 2013; Pizarro *et al.*, 2016, Oliveira *et al.* 2016) e do 2,4-D (Kobraei & White, 1996; Råberg *et al.*, 2003; Uji *et al.*, 2016) sobre a biota aquática, ainda são escassos os estudos que investigaram os efeitos do uso combinado destes dois herbicidas (Relyea, 2009). Esta constatação é ambientalmente bastante preocupante, uma vez que o uso desta combinação têm aumentado com o aumento do número biótipos resistentes ao glifosato, sem que, entretanto, estudos dos seus efeitos em organismos e/ou sistemas não-alvo tenham acompanhado o crescimento do uso desta prática de manejo agrícola.

Assim, dada a importância de se compreender os efeitos que a combinação de glifosato e 2,4-D pode causar nesse importante filo algal, este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar os possíveis impactos da exposição destas substâncias sobre as resposta fotossintética de quatro espécies de macroalgas verdes lólicas.

Diante dos potenciais efeitos destes herbicidas na fotossíntese de produtores primários, e particularmente, no pontencial dano oxidativo que ambos os herbicidas tendem a causar, espera-se que as macroalgas verdes testadas demonstrem uma forte inibição da resposta fotossintética, apresentando, principalmente, danos no centro de reação do fotossistema II e degradação da concentração de clorofila *a*.

Materiais e Métodos

As macroalgas coletadas em riachos de baixas ordens (2ª e 3ª ordens) (Tabela 1) foram transportadas *in vivo* para o laboratório para a realização da limpeza, utilizando microscópio estereoscópico e pincel de cerdas duras e jatos de água destilada, e em seguida, o processo de pesagem do material (peso fresco - 150 ± 10 mg).

Após a pesagem, os organismos foram transferidos para erlenmeyers contendo 100 mL de meio básico de Bold (Watanabe, 2005) e mantidos aclimatados por três dias em estufas tipo B.O.D. (marca Nova Ética, modelo 411/FDP355) com fotoperíodo de 12/12 horas e nas mesmas condições de temperatura ($20 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e irradiância ($140 \pm 15 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante todo o experimento.

Para investigar a resposta fotossintética das macroalgas verdes expostas a uma mistura de Roundup® (glifosato) e Bratt® (2,4-D), foram utilizadas as concentrações recomendadas pelos fabricantes, que, para o glifosato, corresponde a 3,5 mg de ingrediente ativo [i.a.] L^{-1} , (Vera *et al.*, 2012; Giesy *et al.*, 2000) e para o 2,4-D corresponde a 2 mg i.a. L^{-1} (Kobraei & White, 1996; Parsons *et al.*, 2001), respectivamente.

O delineamento empregado neste experimento seguiu as diretrizes da Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCDE) para o teste de produtos químicos 221 (OECD, 2011). Este delineamento, embora tenha sido proposto para *Lemna* sp., já foi aplicado utilizando-se macroalgas verdes como organismos testes (Oliveira *et al.*, 2016), e consiste em um teste semi-estático com análise de resposta no primeiro (T1) e no sétimo dia (T7) após a exposição ao herbicida e com a renovação da meio de cultura no terceiro e quinto dia para evitar a perda de nutrientes e ingredientes ativos (Nešković *et al.*, 1996; OECD, 2011).

As respostas fotossintéticas das macroalgas verdes submetidas aos efeitos dos tratamentos experimentais foram analisadas pelas variações entre os grupos tratados (ou seja,

sob exposição a combinação dos herbicidas testados) em relação ao grupo controle (ou seja, na ausência de exposição aos herbicidas testados). Assim, foram analisados parâmetros fotossintéticos de cada amostra obtidos/calculados a partir dos seguintes métodos analíticos: i) evolução do oxigênio dissolvido, com a aplicação da técnica dos frascos claros e escuros; ii) fluorescência da clorofila *a*, com auxílio de fluorômetro subaquático e iii) concentração de clorofila *a*, por meio de método espectrofotométrico.

Através do método dos frascos claros e escuros (Littler & Arnold, 1985; Thomas, 1988), foram determinadas as taxas de fotossíntese líquida e respiração no escuro para ambos os grupos experimentais (controle e tratamento), seguindo os mesmos procedimentos descritos por Necchi & Zucchi (2001) e Vieira & Necchi (2003). Dessa forma, para a análise da fotossíntese líquida, cinco amostras foram colocadas em frascos de 110 mL de vidro com 98,5 % de transparência (os chamados frascos claros), e mantidas em incubação em condições constantes de temperatura ($20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), iluminação ($140 \pm 15 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e agitação ($100 \pm 2,5$ r.p.m.) durante uma hora. O mesmo procedimento foi utilizado para o cálculo da respiração no escuro, porém, três amostras algais foram incubadas em frascos cobertos com papel alumínio sob total ausência de luz (os chamados frascos escuros). As concentrações inicial (ou seja, medida antes do período de incubação) e final do oxigênio dissolvido (ou seja, medida após o período de incubação), tomadas para cada grupo experimental em cada dia da análise (T1 e T7) foram mensuradas com o uso de um oxímetro de bancada equipado com uma sonda com auto-agitação (Yellow Springs Instruments, modelo 5100).

As medidas de fluorescência da clorofila *a*, por sua vez, foram realizadas utilizando o fluorômetro subaquático Diving-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Após o período de aclimação no escuro (30 minutos – Lichtenthaler *et al.*, 1981; Yannicari *et al.*, 2012), Nos dias T1 e T7, cinco réplicas de cada tratamento foram submetidas a uma “Curva de Indução” (Schreiber *et al.*, 1995) utilizando-se luz actínica com intensidade de $285 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, e pulsos de saturação a cada 15 segundos, com duração de 0,8 segundos e intensidade de $2000 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os parâmetros do fotossistema II (PSII) mensurados foram: rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) (Genty *et al.*, 1989; Schreiber *et al.*, 1995; Necchi, 2005); “quenching” fotoquímico (qP) (Baker & Rosenqvist, 2004); dissipação de calor no complexo antena do PSII (D) (Demmig-Adams *et al.*, 1996); e dissipação de calor pelo centro de reação do PSII (E) (Demmig-Adams *et al.*, 1996).

Ao final do experimento, após as análises de fotossíntese líquida, respiração no escuro e dos parâmetros relacionados à fluorescência da clorofila *a*, as amostras foram submetidas às análises de concentração de clorofila *a* corrigida da feofitina por espectrofotometria (Biospectro

modelo SP220). As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda 665 e 750 nm, utilizando-se acetona 90% para a calibração (branco da amostra) (Wetzel & Likens, 2000).

Os resultados encontrados foram submetidos inicialmente a estatística descritiva, ao teste de normalidade Ryan-Joiner, e ao teste de igualdade de variâncias pelo método Levene. Em seguida, para comparar as médias obtidas de cada grupo experimental, foi realizado o teste *t* de Student para amostra não pareadas (dados paramétricos) ou o teste de Mann-Witney (dados não paramétricos), ambos realizados através do software Minitab, versão 17 (Ryan *et al.*, 1985). Os efeitos da interação entre o tratamentos e o tempo de exposição sobre as respostas fotossintéticas das macroalgas verdes testadas foram avaliadas pela da Análise de Variância Multivariada (MANOVA), também no Minitab, versão 17 (Ryan *et al.*, 1985). Para a construção dessas análises, as respostas fotossintéticas (ou seja, os parâmetros fotossintéticos medidos ou calculados) foram consideradas variáveis dependentes, enquanto que o tempo de exposição e o tratamento como covariáveis. Quando os pressupostos de normalidade e de igualdade de variância não foram alcançados, a interação entre tempo de exposição e concentração foi investigada usando Análise Multivariada de Permutação não paramétrica (PERMANOVA) baseada na distância euclidiana e 9999 permutações no software PAST (Hammer *et al.*, 2001).

Resultados

Todos os resultados numéricos (médias $\pm$ desvio-padrão) de cada parâmetro mensurado/calculado, assim como o resultados das análises estatística, estão apresentados nas Tabelas 2-4 e nas Figuras 1 e 2.

Evolução do oxigênio dissolvido

Efeitos significativos encontrados nos experimentos envolvendo o método da evolução do oxigênio dissolvido foram a redução no valor da taxa de fotossíntese líquida de *Spirogyra* sp., em T1, e o aumento da taxa de respiração no escuro de *Desmidium grevillei*, em T7 (Tabela 2). A redução da taxa de fotossíntese líquida de *Spirogyra* sp. foi da ordem de -21,3% em relação ao grupo controle ($t = 2,4$ e $p \leq 0,05$), ao passo que, o aumento na taxa de respiração no escuro de *Desmidium grevillei* correspondeu a +116% ($t = -6,8$ e $p \leq 0,01$) (Tabela 2).

Os resultados da MANOVA mostraram que a interação entre tempo de exposição e tratamento foi significativa para taxa de fotossíntese líquida nas macroalgas *Oedogonium* sp. ($F = 6,9$ e $p \leq 0,05$) e *Spirogyra* sp. ($F = 5,9$ e $p \leq 0,05$), e para a taxa de respiração no escuro em *Desmidium grevillei* ($F = 27,7$ e $p \leq 0,01$) e *Spirogyra* sp. ($F = 7,0$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 3).

Clorofila *a*

O resultado da concentração de clorofila *a* foi estatisticamente significativo somente na análises realizada no sétimo dia de exposição à mistura de herbicida (T7), com um aumento de +11,8% para *Desmidium grevillei*, quando comparados com o grupo controle ($t = -2,8$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 2).

Entretanto, o resultado da MANOVA mostrou efeitos significativos da interação entre tempo de exposição e tratamento sobre a concentração de clorofila *a* para as espécies *Desmidium grevillei* ($F = 8,3$ e $p \leq 0,01$) e *Spirogyra* sp. ($F = 2,8$ e $p \leq 0,05$) (Tabela 3).

Fluorescência da clorofila *a*

Quanto aos parâmetros obtidos a partir dos dados de fluorescência da clorofila *a*, todas as espécies de macroalgas verdes testadas apresentaram efeitos estatisticamente significativos, em pelo uma das datas experimentais, quando comparados os resultados dos tratamentos experimentais aos do grupo controle (Tabela 4, Figuras 1 e 2).

Nitella subglomerata e *Oedogonium* sp., após um dia de exposição à mistura de herbicidas (T1), apresentaram aumento no parâmetro que avalia a dissipação de calor pelo centro de reação (E). Estes aumentos no parâmetro (E) foram da ordem de +44,8% para *Nitella subglomerata* ($t = -5,5$ e $p \leq 0,01$), e de +27,5% para *Oedogonium* sp. ($t = -2,9$ e $p \leq 0,05$) (Fig. 1). Por outro lado, observou-se uma redução nos valores do parâmetro "quenching" fotoquímico (qP) para *Nitella subglomerata* e para *Oedogonium* sp., de modo que para a primeira, os valores deste parâmetro foram -38,6% menores do que os observados para o grupo controle ($t = 5,4$ e $p \leq 0,01$), e para a segunda -22,8% ($t = 2,8$ e $p \leq 0,05$) (Fig. 2). Adicionalmente, *Nitella subglomerata* apresentou uma redução de -39,2% no parâmetro rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}) ($t = 4,4$ e $p \leq 0,01$).

Para *Spirogyra* sp. houve uma redução inicial (em T1) de -9,5% nos valores do parâmetro (Φ_{PSII}) ($t = 2,9$ e $p \leq 0,05$), porém na análise realizada em T7 observou-se uma inversão desta tendência, com o registro de um aumento nos valores deste parâmetro (cerca de +134,5% em relação ao grupo controle; $t = 4,2$ e $p \leq 0,01$). Ainda para *Spirogyra* sp., em T7, observou-se um aumento (+199,2% em relação ao grupo controle) nos valores dos parâmetros (E) ($t = -5,5$ e $p \leq 0,01$) ($t = 4,2$ e $p \leq 0,01$), além de uma redução no parâmetro (D) (-42,9%) ($W = 40$ e $p \leq 0,05$) (Fig. 1).

Resultado similar foi reportado para *Desmidium grevillei* que experimentou, após sete dias de exposição (T7), redução de -19,5%, em relação ao grupo controle, nos valores do

parâmetro (D) ($t = 6,5$ e $p \leq 0,01$), e aumentos de +19,6% nos valores do parâmetro (E) ($t = -3,8$ e $p \leq 0,01$), de +68% do parâmetro (Φ_{PSII}) ($t = -6,4$ e $p \leq 0,001$) (Figura 1), e de +29,4% no parâmetro (qP) ($t = -3,8$ e $p \leq 0,001$) (Figs. 1 e 2).

A interação entre tempo de exposição e tratamento, usando os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* como covariáveis, foi significativa para as espécies *Nitella subglomerata*, *Desmidium grevillei*, e *Spirogyra* sp (Tabela 4). Em *Nitella subglomerata* foram significativos os parâmetros (Φ_{PSII}) ($F = 23,1$ e $p \leq 0,01$), (qP) ($F = 26,9$ e $p \leq 0,01$), e (E) ($F = 13,9$ e $p \leq 0,01$). Por sua vez, *Desmidium grevillei* apresentou efeitos significativos da interação nos parâmetros (D) ($F = 11,9$ e $p \leq 0,01$) e (E) ($F = 8,1$ e $p \leq 0,05$). Enquanto que para *Spirogyra* sp. foram significativos os parâmetros (Φ_{PSII}) ($F = 22,7$ e $p \leq 0,01$), (D) ($F = 29,2$ e $p \leq 0,01$) e (E) ($F = 24,8$ e $p \leq 0,01$) (Tabela 4).

Discussão

Os resultados observados em *Nitella subglomerata* e *Oedogonium* sp. mostraram que os efeitos negativos no aparato fotossintético, verificados através dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, não resultaram em qualquer variação na produtividade (taxa de fotossíntese líquida e respiração no escuro) ou na concentração de clorofila *a* (Tabela 2, Figs. 1 e 2). A redução na produtividade (p.ex., na taxa de fotossíntese líquida) em decorrência de efeitos negativos no aparato fotossintético (p.ex, nos valores de Φ_{PSII}) foi reportado somente para *Spirogyra* sp., em T1 (Tabela 2, Fig. 1).

Por sua vez, *Spirogyra* sp. e *Desmidium grevillei* apresentaram em T7 um aumento na dissipação de calor pelo centro de reação (E) que, embora seja nocivo para a manutenção do centro de reação do PSII, foi acompanhado pelo aumento nos valores do rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}), para ambas as macroalgas. Por sua vez, a ausência de efeitos na produtividade (fotossíntese líquida e respiração no escuro) para *Spirogyra* sp. e os aumentos no parâmetro (qP), além dos aumentos reportados para a taxa de respiração no escuro e para a concentração de clorofila *a* reportados para *Desmidium grevillei* (Figs. 1 e 2), não permitem afirmar que estas macroalgas expostas às formulações comerciais de glifosato e 2,4-D estejam sofrendo inibições na fotossíntese em T7.

Comparando ainda estes resultados com os observados no tratamento com o Roundup® na concentração de 3,5 mg.L⁻¹ (ver Capítulo II desta tese), com exceção de *Oedogonium* sp., todas as macroalgas tiveram os efeitos inibitórios na resposta fotossintética amenizados quando o Roundup® foi administrado em conjunto com o 2,4-D (Bratt®). Portanto, é possível concluir que, para a maioria das macroalgas testadas, a formulação comercial do herbicida 2,4-D,

quando administrada na concentração recomendada pelo fabricante (2 mg L^{-1}), apresentou efeitos antagonísticos aos da formulação comercial de glifosato, ou seja o Roundup®.

De fato, vários trabalhos têm relatado que, na concentração recomendada pelo fabricante, o herbicida 2,4-D pode ser capaz de estimular o crescimento algal (Cooke *et al.*, 2002; Kobraei & White, 1996, Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz, 2014) e que os efeitos deletérios causados pelo 2,4-D sobre estes organismos tendem a ocorrer somente quando expostos a altas concentrações (20 mg L^{-1} – Wong, 2000; 40 mg L^{-1} - Kobraei & White, 1996). Em contrapartida, um estudo desenvolvido com a microalga verde *Scenedesmus obliquus*, exposta ao 2,4-D grau técnico, mostrou que o rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}) foi reduzido quando submetido a concentrações iguais e inferiores a 2 mg L^{-1} (Zhu *et al.*, 2016).

Ao analisar o tratamento combinado de glifosato e 2,4-D na literatura, há a descrição de uma variedade de tipos de respostas fisiológicas que, dependendo do organismo testado, pode resultar em efeitos antagonísticos ou sinérgicos (Peterson *et al.*, 2016; Grossmann, 2010).

Para além das variações nas respostas fotossintéticas observadas quando diferentes organismos são expostos a uma combinação de herbicidas a base de glifosato e 2,4-D, um fator que tem sido descrito como relevante para determinar o tipo e a intensidade dos efeitos é o tempo de exposição. A importância do tempo de exposição torna-se evidente ao se analisar os dados das análises multivariadas (Tabelas 3 e 4) que foram conduzidas no presente estudo. Por estas análises, fica claro que a interação entre tempo de exposição e tratamento representa a influência mais significativa sobre as respostas fotossintéticas observadas, sendo tal padrão particularmente evidente para *Spirogyra* sp, que apresentou alterações significativas na taxa de fotossíntese líquida (T1) e nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (T1 e T7).

Estes resultados sugerem que para as macroalgas verdes, com base nos dados do presente estudo e corroborados por dados da literatura (p.ex., Peterson *et al.*, 2016; Grossmann, 2010), o herbicida 2,4-D (Bratt®) tende a compensar, ao longo do tempo de exposição, os efeitos inibitórios sobre a fotossíntese produzidos pela exposição ao glifosato (Roundup®), refutando integralmente a nossa hipótese inicial.

Por fim, sugere-se que estudos futuros abordem também a combinação dos principais produtos de degradação dos herbicidas 2,4-D e glifosato (2,4,5-T e AMPA, respectivamente), para que se compreenda os efeitos desta mistura nas macroalgas dentro de uma perspectiva temporal maior, englobando também a dinâmica de degradação conjunta desses herbicidas.

Referências Bibliográficas

Annett, R., Habibi, H.R., & Hontela, A. 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5): 458-479.

Arcsott, D.B., Bowden, W.B. & Finlay, J.C. 1998. Comparison of epilithic algal and bryophyte metabolism in an Arctic tundra stream, Alaska. *Journal of the North American Benthological Society*, 17(2): 210-227.

Baker, N.R. & Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of experimental botany*, 55(403): 1607-1621.

Battaglin, W.A., Meyer, M.T., Kuivila, K.M. & Dietze, J.E. 2014. Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. *Journal of the American Water Resources Association*, 50(2): 275-290.

Botelho, R.G., Cury, J.P., Tornisiello, V.L. & Santos, J.B. 2012. Herbicides and the Aquatic Environment, In *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*, Mohammed Nagib Hasaneen (Ed.), ISBN: 978-953-307-803-8, InTech, Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/herbicides-properties-synthesis-and-control-of-weeds/herbicides-and-theaquatic-environment>>. Acesso: 13/09/2017.

Christoffoleti, P.J. 2001. Análise comparativa do crescimento de biótipos de picão-preto (*Bidens pilosa*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. *Planta Daninha*, 19: 75-83.

Christoffoleti, P.J. & López-Ovejero, R.F. 2008. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no Mundo. In: Pedro Jacob Christoffoleti. (Org.). *Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas*. 3 ed. Piracicaba: HRAC-BR, 3-26.

Christoffoleti, P.J. & Nicolai, M. 2016. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no Mundo: 4 ed. Pedro Jacob Christoffoleti & Marcelo Nicolai (Orgs.) Piracicaba: HRAC-BR, 262p.

Daouk, S., Copin, P.J., Rossi, L., Chèvre, N. & Pfeifer, H.R. 2013. Dynamics and environmental risk assessment of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in a small vineyard river of the Lake Geneva catchment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(9): 2035-2044.

Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., Barker, D.H., Logan, B.A., Bowling, D.R. & Verhoeven, A.S. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 98(2): 253-264.

DeNicola D.M., Hogland K.D. & Roemer S.C. 1992. Influence of canopy cover on spectral irradiance and periphyton assemblages in a prairie stream. *Journal of the North American Benthological Society* 11: 391-404.

Devine, M.D., Duke, S.O. & Fedtke, C. 1993. *Physiology of herbicide action*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Forlani, G., Pavan M., Gramek, M., Kafarski, P. & Lipok, J. 2008. Biochemical Bases for a Widespread Tolerance of Cyanobacteria to the Phosphonate Herbicide Glyphosate. *Plant and cell physiology*, 49(3): 443-456.

Genty, B., Briantais, J.M. & Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990(1): 87-92.

Giesy, J.P., Dobson, S. & Solomon, K.R. 2000. *Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide*. Springer New York, 120p.

Gomes, M.P., Le Manac'h, S.G., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lucotte, M., & Juneau, P. 2017. Glyphosate-Dependent Inhibition of Photosynthesis in Willow. *Frontiers in plant science*, 8: 207.

Gomes, M.P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M. & Juneau, P. 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of experimental botany*, 65(17): 4691-4703.

Grossmann, K. 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest management science*, 66(2): 113-120.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, (4).

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2016. *Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002*. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso: 08/09/2017.

Kobraei, M.E. & White, D.S. 1996. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on Kentucky algae: simultaneous laboratory and field toxicity testings. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 31(4), 571-580.

Li, M., Tank, H., Kennedy, A., Zhang, H., Downer, B., Ouse, D. & Liu, L. 2013. Enlist Duo herbicide: a novel 2, 4-D plus glyphosate premix formulation with low potential for off-target movement. In *Pesticide Formulation and Delivery Systems: 32 nd Volume, Innovating Legacy Products for New Uses*. ASTM International, West Conshohocken, PA.

Li, M., Tank, H., Liu, L., Qin, K., Wilson, S.L., Ouse, D.G. 2010. High-strength, herbicidal compositions of glyphosate and 2,4- D salts. *U.S. patent application*, No: 12/763,566.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Döll, M., Fietz, H. J., Bach, T., Kozel, U., Meier, D. & Rahmsdorf, U. 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis research*, 2(2): 115-141.

Little, M.M. & Arnold, K.E. 1985. Electrodes and chemicals. In: Little, M. M. & Little, D. S. (eds): *Handbook of phycological methods. Ecological field methods: Macroalgae*. Cambridge University Press, Cambridge. 349-375.

Moreira, M.S., Nicolai, M., Carvalho, S.J.P. & Christoffoleti, P.J. 2007. Resistência de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. *Planta Daninha*, 25(1): 157-164.

Necchi, O.Jr. 2004. Light-related photosynthetic characteristics of lotic macroalgae. *Hydrobiologia* 525: 139-155.

Necchi, O. Jr. 2005. Light-related photosynthetic characteristics of freshwater rhodophytes. *Aquatic Botany* 82: 193-209.

Necchi, O.Jr. & Zucchi, M.R. 2001. Photosynthetic performance of freshwater Rhodophyta in response to temperature, irradiance, pH and diurnal rhythm. *Phycological Research*, 49: 305-318.

Nešković N.K., Poleksić V., Elezović I., Karan V. & Budimir M. 1996. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 295-302.

OECD. Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento. 2011. *Lemna* sp. *Teste de inibição do crescimento*. Diretriz 221. OECD, Paris.

Okada, H. & Watanabe, Y. 2002. Effect of physical factors on the distribution of filamentous green algae in the Tama River. *Limnology* 3:121-126.

Oliveira, R.C., Boas, L.K.V. & Branco, C.C.Z. 2016. Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae). *Phycologia*, 55(5): 577-584.

Parsons, J.K., Hamel, K.S., Madsen, J.D. & Getsinger, K.D. 2001. The use of 2,4-D for selective control of an early infestation of Eurasian watermilfoil in Loon Lake, Washington. *J. Aquat. Plant Manage.* 39(11): 7-125.

Peres, C.K., Tonetto, A.F., Garey, M.V. & Branco, C.C.Z. 2017. Canopy cover as the key factor for occurrence and species richness of subtropical stream green algae (Chlorophyta). *Aquatic Botany*, 137: 24-29.

Pérez, G.L., Vera, M.S. & Miranda, M. 2011. Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. In *Herbicides and Environment*, Andreas Kortekamp (Ed.), ISBN: 978-953-307-476-4. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/effects-of-herbicide-glyphosate-and-glyphosate-based-formulations-on-aquatic-ecosystems>> Acesso: 02/05/2013.

Peterson, M.A., McMaster, S.A., Riechers, D.E., Skelton, J., & Stahlman, P.W. 2016. 2, 4-D past, present, and future: a review. *Weed Technology*, 30(2): 303-345.

Pizarro, H., Vera, M.S., Vinocur, A., Pérez, G., Ferraro, M., Helman, R.M. & dos Santos Afonso, M. 2016. Glyphosate input modifies microbial community structure in clear and turbid freshwater systems. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(6): 5143-5153.

Poiger, T., Buerge, I.J., Bächli, A., Müller, M.D. & Balmer, M. E. 2017. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2): 1588-1596.

Råberg, S., Nyström, M., Erös, M. & Plantman, P. 2003. Impact of the herbicides 2, 4-D and diuron on the metabolism of the coral *Porites cylindrica*. *Marine environmental research*, 56(4): 503-514.

Relyea, R.A. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*, 159(2): 363-376.

Ryan, B.F., Joiner, B.L. & Ryan, T.A., 1985. Minitab handbook. Duxbury Press, Boston, USA.

Sáenz, M.E. & Di Marzio, W.D. 2009. Ecotoxicidad del herbicida glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. *Limnetica*, 28(1): 149-158.

Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C. 1995. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. Em: Schulze, E.D. & Caldwell, M.M. (eds.): *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin. 49-70.

Sciumbato, A.S., Chandler, J.M., Senseman, S.A., Bovey, R.W. & Smith, K. L. 2004. Determining exposure to auxin-like herbicides. I. Quantifying injury to cotton and soybean. *Weed Technology*, 18(4): 1125-1134.

Sheath, R.G. & Burkholder, J. 1985. Characteristics of softwater stream in Rhode Island. II: Composition and seasonal dynamics of macroalgae communities. *Hydrobiologia* 128: 109-118.

Singh, R.K., Philip, L. & Ramanujam, S. 2017. Removal of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in aqueous solution by pulsed corona discharge treatment: Effect of different water constituents, degradation pathway and toxicity assay. *Chemosphere*, 184: 207-214.

Stevenson, R.J., Bothwell, M.L. & Lowe, R.L. 1996. *Algal ecology-freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, 150-181.

Takano, H.K., Junior, R.S.O., Constantin, J., Biffe, D.F.; Franchini, L.H.M.; Braz, G.B.P., Rios, F.A., Gheno, E.A. & Gemelli, A. 2013. Efeito da adição do 2, 4-D ao glyphosate para o controle de espécies de plantas daninhas de difícil controle. *Revista Brasileira de Herbicidas*, 12(1): 1-13.

Thomas, M.L.H. 1988. Photosynthesis and respiration of aquatic macro – flora using the light and dark bottle oxygen method and dissolved oxygen analyser. Em: Lobban, C. S.; Chapman, D. J. & Kremer, B. P. (eds.): *Experimental Phycology: A laboratory Manual*. Cambridge University Press, Cambridge. 64-77.

Uji, T., Nanaumi, D., Kawagoe, C., Saga, N. & Miyashita, K. 2016. Factors influencing the induction of adventitious bud and callus in the brown alga *Sargassum horneri*. *Journal of applied phycology*, 28(4): 2435-2443.

Ulgum, A.R., Vargas, L., Agostinetto, D., Dal Magro, T., Westendorff, N.R. & Holz, M.T. 2013. Manejo de capim pé-de-galinha em lavouras de soja transgênica resistente ao glifosato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(1): 17-24.

Vera, M.S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M.M., Juárez, A., Molina, M.C.R., Tell, G. & Pizarro, H. 2012. Direct and indirect effects of the

glyphosate formulation Glifosato Atanor on freshwater microbial communities.

Ecotoxicology, 21: 1805-1816.

Vieira, J.Jr. & Necchi, O.Jr. 2003. Photosynthetic characteristic of charophytes from tropical ecosystems. *Phycological Research*, 51: 51 - 60.

Vivancos, P.D., Driscoll, S.P., Bulman, C.A., Ying, L., Emami, K., Treumann, A., Mauve, C., Noctor, G. & Foyer, C.H. 2011. Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant physiology*, 157(1): 256-268.

Watanabe, M.M. 2005. Freshwater Culture Media. In: Andersen, R. A. (ed.) *Algal Culture Techniques*. Elsevier, Amsterdam, 13-20.

Wetzel, R.G. & Likens, G.E. 2000. *Limnological Analyses*, 3^aed. Springer. New York.

Yamada, T. & Castro, P.D.C. 2007. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. *Informações Agronômicas*, 119: 1-32.

Yanniccari, M., Tambussi, E., Istilart, C. & Castro, A.M. 2012. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 210-217.

Zhu, X., Sun, Y., Zhang, X., Heng, H., Nan, H., Zhang, L., Huang, Y. & Yang, Z. 2016. Herbicides interfere with antigrazer defenses in *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere*, 162, 243-251.

Zobiole, L.H.S., Kremer, R.J. & Constantin, J. 2012. Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175(2): 319-330.

Tabela 1. Lista de espécies com a localização e classe de sombreamento (DeNicola *et al.* 1992) dos riachos onde foram coletados.

Espécimes	Localização	Classe de Sombreamento
<i>Oedogonium</i> sp.	Rio do Pari (Platina/SP) 22°40'11'' S - 50°28'59'' O	Aberto
<i>Nitella subglomerata</i> A. Braun	Rio Cubatão (Cajuru/SP) 21°14'14'' S - 47°13'15'' O	Parcialmente Sombreado
<i>Spirogyra</i> sp.	Ribeirão Pirapitininga (Assis/SP) 22°38'28'' S - 50°20'28'' O	Aberto
<i>Desmidium grevillei</i> (Kützinger ex Ralfs) De Bary	Ribeirão das Antas (Assis/SP) 22°34'28,2" S - 50°25'6,9" O	Parcialmente Sombreado

Tabela 2. Taxas de fotossíntese líquida (mg de O₂.g⁻¹ de PS.h⁻¹), respiração no escuro (mg de O₂.g⁻¹ de PS.h⁻¹) e concentração de clorofila *a* (µg.mg⁻¹ de PS) em termos de média e desvio padrão das espécies de macroalgas expostas à mistura dos herbicidas Roundup® (3,5 mg i.a.L⁻¹) e Bratt® (2 mg i.a.L⁻¹). Fotos.: taxa de fotossíntese líquida; Resp.: taxa de respiração no escuro; Clor.: concentração de clorofila *a*).

		1º dia (T1)			7º dia (T7)		
		Fotos.	Resp.	Clor.	Fotos.	Resp.	Clor.
<i>Oedogonium</i> sp.	0	10,5±1,3a	3,5±1,1a	14,7±3,2a	8,6±2,3a	7,1±2,6a	17,7±4,1a
	3,5+2	12,5±2,4a	2,8±0,2a	13,9±4,3a	6,2±0,6a	4,5±0,8a	15,6±4,5a
<i>Nitella subglomerata</i>	0	5,1±2,0a	16,8±9,6a	10,4±3,6a	6,4±1,1a	10,3±1,5a	5,7±1,0a
	3,5+2	5,2±3,1a	6,7±3,3a	7,7±3,2a	7,4±3,6a	10,4±1,9a	5,6±1,2a
<i>Spirogyra</i> sp.	0	36,1±3,4b	61,9±4,1a	7,3±3,9a	5,8±1,7a	42,9±5,9a	1,1±0,6a
	3,5+2	28,3±6,1a	70,2±0,8a	4,9±1,5a	6,4±2,0a	35,6±7,0a	0,8±0,8a
<i>Desmidium grevillei</i>	0	35,1±17,9a	112,5±5,3a	7,0±4,8a	25,4±8,8a	40,4±8,0a	2,1±0,8a
	3,5+2	34,0±5,4a	80,0±22,6a	3,7±1,9a	33,2±7,7a	87,3±8,7b	4,8±2,5b

Médias seguidas por letras distintas apresentam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Análise de variância multivariada (MANOVA), considerando a taxa de fotossíntese líquida (Fotos.), a taxa de respiração no escuro (Resp.) e concentração de clorofila *a* (Clor.) como variáveis dependentes e tempo de exposição e o tratamento com a mistura dos herbicidas Roundup® (3,5 mg i.a.L⁻¹) e Bratt® (2 mg i.a.L⁻¹) como covariáveis.

		Fotos.		Resp.		Clor.	
		F	P	F	p	F	p
<i>Oedogonium</i> sp.	Tempo	17,3	<0,01	0,04	0,84	38,9	<0,01
	Tratamento	2,3	0,13	7,22	<0,05	0,1	0,96
	Interação	6,9	<0,05	24,3	<0,01	0,6	0,57
<i>Nitella subglomerata</i>	Tempo	11,2	<0,01	3,0	0,07	2,3	0,12
	Tratamento	1,8	0,18	1,3	0,24	1,0	0,3
	Interação	4,7	<0,05	-2,1	0,72	2,1	0,15
<i>Spirogyra</i> sp.	Tempo	30,7	<0,01	21,8	<0,01	50,4	<0,01
	Tratamento	13,1	<0,01	13,4	<0,01	24,9	<0,01
	Interação	2,4	0,08	4,7	<0,05	6,9	<0,01
<i>Desmidium grevillei</i>	Tempo	44,1	<0,01	31,0	<0,01	0,1	0,77
	Tratamento	2,1	0,07	6,9	<0,01	6,2	<0,01
	Interação	-0,6	0,09	3,3	<0,05	3,7	<0,05

Tabela 4. Análise de variância multivariada (MANOVA), considerando o rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}), o “*quenching*” fotoquímico (qP), a dissipação de calor no complexo antena (D) e a dissipação de calor no centro de reação (E) como variáveis dependentes e o tempo de exposição e o tratamento com a mistura dos herbicidas Roundup® (3,5 mg i.a.L⁻¹) e Bratt® (2 mg i.a.L⁻¹) como covariáveis.

		Φ_{PSII}		qP		D		E	
		F	P	F	p	F	p	F	P
<i>Oedogonium sp.</i>	Tempo	480,8	<0,01	223,1	<0,01	213,3	<0,01	81,3	<0,01
	Tratamento	1,4	0,24	2,1	0,11	1,3	0,26	2,3	0,09
	Interação	6,0	<0,01	4,1	<0,05	1,1	0,36	3	<0,05
<i>Nitella subglomerata</i>	Tempo	7,9	<0,01	11	<0,01	2,6	0,11	12,9	<0,01
	Tratamento	4,4	<0,01	5,3	<0,01	2,7	<0,05	6,2	<0,01
	Interação	1,6	0,19	2,7	<0,05	4,1	<0,05	4,3	<0,05
<i>Spirogyra sp.*</i>	Tempo	57,6	<0,01	29,5	<0,01	14,6	<0,01	1,9	0,17
	Tratamento	0,1	0,93	0,3	0,77	0,2	0,86	0,3	0,82
	Interação	2	0,133	2,5	0,07	0,7	0,53	2,4	0,08
<i>Desmidium grevillei</i>	Tempo	34,3	<0,01	31,6	<0,01	28,9	<0,01	2,7	0,1
	Tratamento	3,5	<0,05	3,8	<0,05	5,5	<0,01	9,2	<0,01
	Interação	0,1	0,99	0,1	0,92	0,1	0,99	0,1	0,9

* Para dados não paramétricos foi realizada a Análise de Variância PERMANOVA

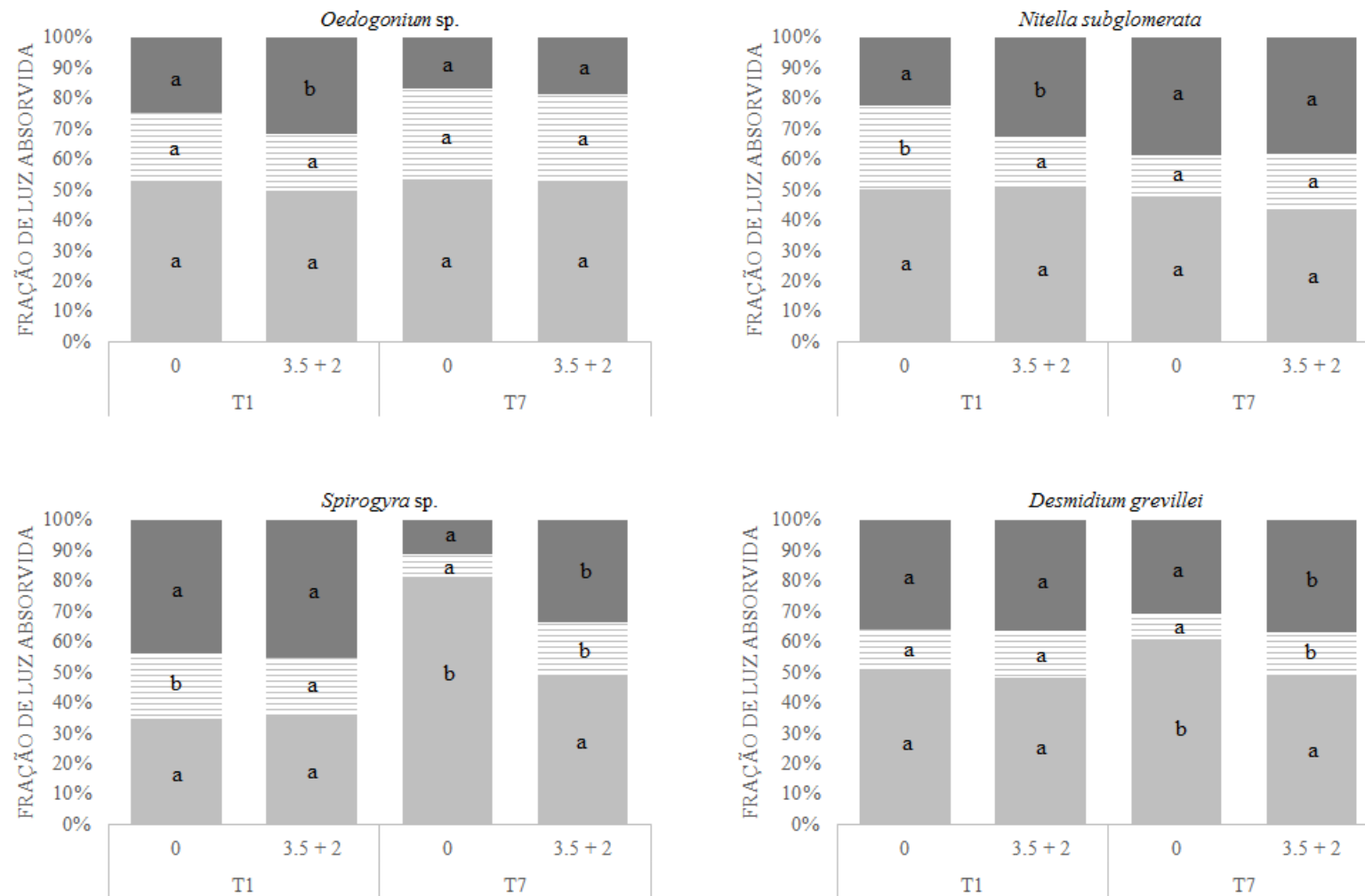


Figura 1. Percentual da fração de luz usado pelas macroalgas na fotossíntese (rendimento quântico efetivo - Φ_{PSII} - listrado), e dissipada na forma de calor pelo complexo antena (D – cinza claro) e pelo centro de reação (E – cinza escuro) quando expostas à mistura de Roundup® (3,5 mg i.a.L⁻¹) e Bratt® (2 mg i.a.L⁻¹). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$).

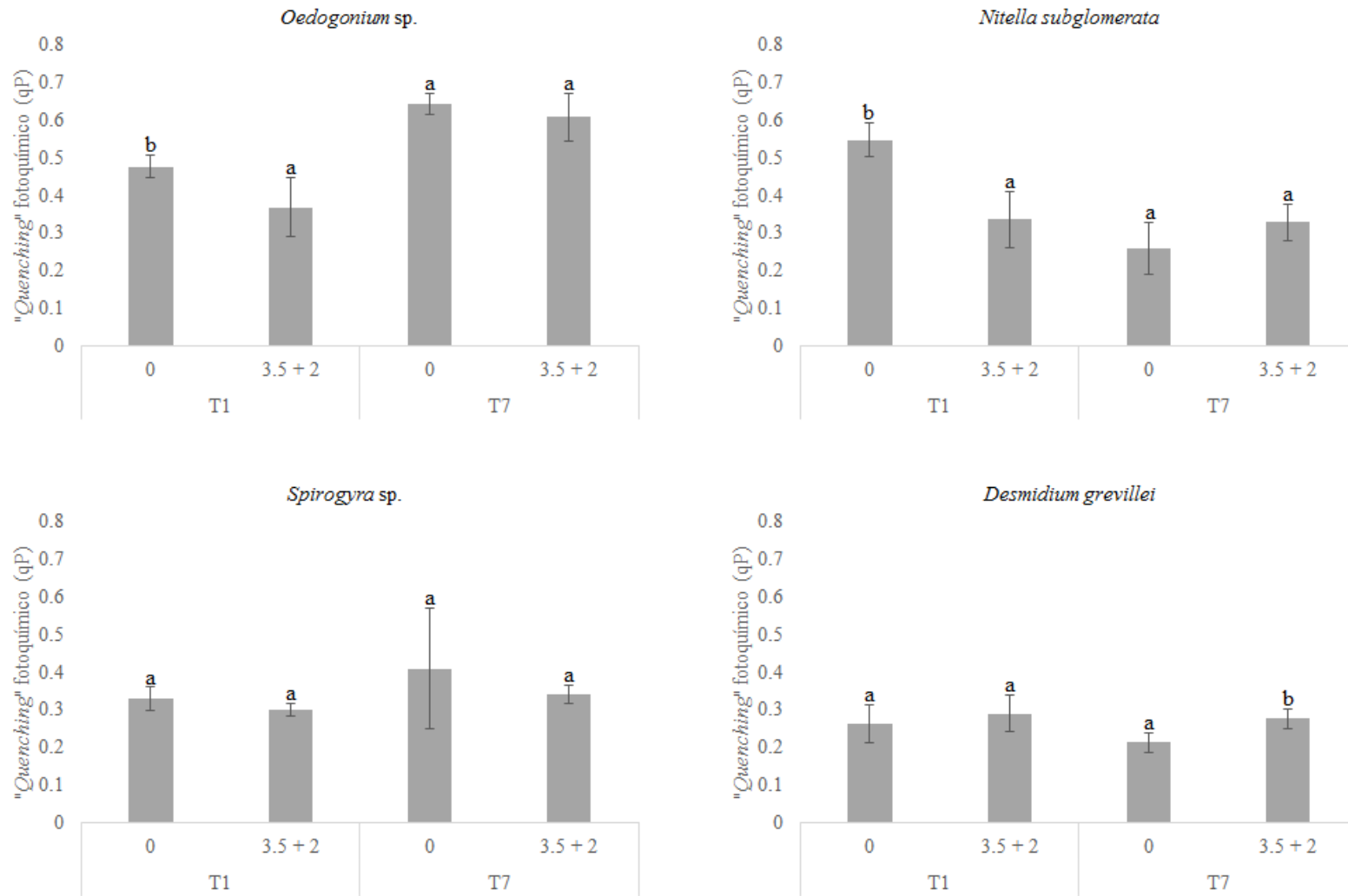


Figura 2. “Quenching” fotoquímico (qP) das espécies de macroalgas analisadas após um (T1) e setes dias (T7) de exposição à mistura dos herbicidas Roundup® (3,5 mg i.a.L⁻¹) e Bratt® (2 mg i.a.L⁻¹). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$).

Conclusão Geral

No presente estudo, foram formuladas três hipóteses de trabalho que foram, então, testadas a partir da condução dos experimentos cujos resultados estão apresentados nos três capítulos desta tese.

A primeira hipótese previa que as respostas fotossintéticas das macroalgas verdes lólicas tenderiam a ser diretamente relacionadas às concentrações dos herbicidas a base de glifosato que foram testadas. Neste sentido, esperava-se, inicialmente, que a exposição dos espécimes às menores concentrações dos herbicidas deveriam produzir efeitos menos prejudiciais à fotossíntese das espécies analisadas do que aqueles produzidos pela exposição às maiores concentrações.

Esta hipótese foi parcialmente corroborada, pois, como apresentado nos Capítulos 1 e 2, ainda que tenha havido uma tendência de distinção na intensidade e na proporção de efeitos significativos nas respostas fotossintéticas das macroalgas entre a concentração de 0,28 mg L⁻¹ e as concentrações de 3,5 e 6 mg L⁻¹, o mesmo não ocorreu quando a concentração de 3,5 mg L⁻¹ foi comparada com a concentração de 6 mg L⁻¹. Isto pode ter ocorrido pela relativa baixa distinção na magnitude dos efeitos produzidos pelas concentrações de 3,5 e 6 mg L⁻¹, quando ambas são comparadas com a concentração de 0,28 mg L⁻¹. Esta constatação, por sua vez, leva a implicações ambientais altamente relevantes, uma vez que a ocorrência de efeitos negativos similares sobre as respostas fotossintéticas de macroalgas verdes lólicas para a concentração recomendada pelo fabricante (3,5 mg L⁻¹) e para a concentração máxima, até então, reportada no ambiente (cerca de 6 mg L⁻¹), permite supor que eventos de contaminação que causam danos severos na fotossíntese destes organismos podem ser mais recorrentes, tanto no tempo como no espaço, do que se imagina. A preocupação com este tipo de questão ambiental se agrava à medida que se observou, como apresentado no Capítulo 1, que danos fotossintéticos significativos (p.ex., redução de -42,1% na taxa de fotossíntese líquida de *Nitella microcarpa* var. *wrightii* exposta ao Roundup®) foram identificados já para a menor concentração testada, cuja referência é tido como o limite legal proposto na legislação brasileira para águas destinadas à irrigação e consumo animal.

Pela segunda hipótese testada no presente estudo, esperava-se que a administração conjunta de Roundup® (3,5 mg L⁻¹) e Bratt® (2 mg L⁻¹) fosse capaz de gerar maiores efeitos inibitórios nas respostas fotossintéticas das espécies de macroalgas investigadas. Contudo, o padrão de resposta fotossintética observado foi surpreendentemente o oposto, refutando integralmente esta hipótese inicial (ver Capítulo 3). A combinação dos herbicidas testados

produziu apenas pequenas alterações nas respostas fotossintéticas para todas as espécies de macroalgas testadas. Mesmo para *Oedogonium* sp., espécie que registrou os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* inibidos pela mistura de herbicidas, apresentou mais alterações significativas quando submetida à exposição exclusiva de Roundup® ou de glifosato grau técnico, especialmente na concentração de 3,5 mg L⁻¹. Até mesmo o AMPA na concentração de 0,03 mg L⁻¹ foi capaz de gerar mais alterações significativas nos parâmetros fotossintéticos mensurados do que o observado para a mistura de Roundup® e Bratt®. Um resultado que divergiu deste padrão geral, que aparentemente expõe um efeito antagônico entre os herbicidas a base de glifosato e 2,4-D, foi registrado para *Spirogyra* sp. Para este táxon, muitas variáveis fotossintéticas mostraram ser bastante sensíveis à exposição a esta combinação de herbicidas, assim como já havia sido percebido nos experimentos realizados com os herbicidas administrados individualmente (ver Capítulo 2). Estes resultados, aliás, sugerem que *Spirogyra* sp. pode ser considerada, entre as macroalgas testadas, como aquela que melhor representaria um bioindicador ideal na identificação de contaminação de ambientes lóticos de baixa ordem pelos herbicidas testados.

Sobre as variáveis fotossintéticas analisadas, ainda que seja difícil interpretar e conciliar os métodos de evolução do oxigênio dissolvido com os parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, a utilização conjunta desses métodos mostrou-se satisfatória para a detecção das anomalias geradas pelos herbicidas testados analisados neste trabalho. Uma vez que a técnica da fluorescência da clorofila *a* avalia as etapas de conversão da energia luminosa em transporte de elétrons dentro do fotossistema II e que a técnica da evolução do oxigênio dissolvido está mais relacionado com o processo de fixação de carbono propriamente dita (Tait *et al.*, 2017), nem sempre é possível reportar um efeito que seja perceptível pelos dois métodos simultaneamente. Tal situação foi identificada em algumas análises realizadas nestes experimentos, com determinados efeitos negativos sendo reportados para parâmetros relativos a fluorescência da clorofila *a* sem um concomitante efeito sobre a taxa de fotossíntese líquida ou de respiração no escuro. O inverso também foi reportado, com efeitos negativos detectáveis nas taxas de fotossíntese líquida e respiração no escuro sem que haja qualquer sinalização por parte dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*. Essa distinção no nível de sensibilidade entre os dois métodos, provavelmente, pode ser atribuída às duas diferentes vias de atuação do glifosato na fotossíntese: a primeira mais relacionada ao consumo da eritrose-4-fosfato, que atua na regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato, e portanto, na fixação de carbono (Geiger *et al.*, 1986; 1987; Shieh *et al.*, 1991), e tendendo a ser mais perceptível pela evolução do oxigênio dissolvido; enquanto que a segunda via está mais relacionada a redução na síntese de proteínas

associadas ao seu centro de reação do fotossistema II (Vivancos *et al.*, 2011; Yanniccari *et al.*, 2012), e da inibição da síntese de carotenoides (Gomes *et al.*, 2017), efeitos que tenderiam a ser mais perceptíveis pela fluorescência da clorofila *a*. Essa diversidade de atuação do herbicida glifosato na fotossíntese demonstra que conciliar os dois métodos pode ser importante para a detecção e compreensão desses efeitos de forma mais ampla e integrada.

A terceira hipótese levantada no presente estudo sugeria que o tempo de exposição das macroalgas aos herbicidas deveria aumentar a magnitude dos efeitos negativos sobre a resposta fotossintética das macroalgas verdes lólicas. De modo geral, embora nem todos os efeitos reportados sejam inibitórios na fotossíntese, os resultados dos experimentos indicam que esta hipótese foi corroborada ao revelar que os efeitos significativos foram mais recorrentes, e ao mesmo tempo mais expressivos (estimulando e/ou inibindo a fotossíntese), no sétimo dia (T7) quando comparado ao primeiro dia de exposição (T1). Talvez, os efeitos reportados para a mistura de herbicidas gere dúvidas quanto a corroboração dessa hipótese, uma vez que, a maior parte dos efeitos significativos foram reportados em T1. Contudo, como já foi discutido anteriormente, a redução do número de efeitos significativos em T7 se deveu, provavelmente, ao efeito antagônico entre os herbicidas glifosato e 2,4-D, e não a uma ausência de sensibilidade por parte das macroalgas testadas. Adicionalmente, a quantidade de resultados significativos para a interação entre tempo de exposição e o tratamento com os herbicidas confirmam esta tendência.

Por fim, o presente trabalho representa apenas uma contribuição inicial para uma vasta área de estudos, extremamente complexa, e carente de informações. Contudo, espera-se que este trabalho seja suficiente para encorajar e direcionar a condução de novas pesquisas desta natureza, considerando a comunidade de produtores primários de ambientes aquáticos tropicais.

Referências Bibliográficas

Geiger, D.R., Kapitan, S.W. & Tucci, M.A. 1986. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. *Plant Physiology*, 82(2): 468-472.

Geiger, D.R., Tucci, M.A. & Serviates, J.C. 1987. Glyphosate effects on carbon assimilation and gas exchange in sugar beet leaves. *Plant Physiology*, 85(2): 365-369.

Gomes, M.P., Le Manac'h, S.G., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lucotte, M., & Juneau, P. 2017. Glyphosate-Dependent Inhibition of Photosynthesis in Willow. *Frontiers in plant science*, 8: 207.

Shieh, W.J., Geiger, D.R. & Serviates, J.C. 1991. Effect of N-(Phosphonomethyl) glycine on carbon assimilation and metabolism during a simulated natural day. *Plant Physiology*, 97(3): 1109-1114.

Tait, L.W., Hawes, I. & Schiel, D.R. 2017. Integration of chlorophyll a fluorescence and photorespirometry techniques to understand production dynamics in macroalgal communities. *Journal of Phycology*. 53(3): 476-485.

Vivancos, P.D., Driscoll, S.P., Bulman, C.A., Ying, L., Emami, K., Treumann, A., Mauve, C., Noctor, G. & Foyer, C.H. 2011. Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant physiology*, 157(1): 256-268.

Yanniccari, M., Tambussi, E., Istilart, C. & Castro, A.M. 2012. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 210-217.

Material Suplementar

Detalhamento dos métodos analíticos utilizados nos estudos experimentais

Método da evolução do oxigênio dissolvido - Técnica dos frascos claros e escuros

Nesta análise, as mudanças na concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura determinam as taxas de fotossíntese líquida e a respiração no escuro (Littler & Arnold, 1985; Thomas, 1988), foram avaliados seguindo os mesmos procedimentos descritos por Necchi & Zucchi (2001) e Vieira & Necchi (2003) (Figura 1).

As concentrações inicial e final do oxigênio, tomadas antes e após cada um dos períodos de incubação para cada dia da análise (1 e 7 dias após a exposição ao herbicida) foram medidas com o uso de um oxímetro de bancada equipado com uma sonda com auto-agitação (Yellow Springs Instruments, modelo 5100).

Para a análise da fotossíntese líquida, cinco réplicas de fragmentos do talo ou talos inteiros das espécies estudadas são colocadas em frascos de 110 mL de vidro com 98,5 % de transparência (os chamados frascos claros), e mantidas em condições constantes de temperatura ($20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), iluminação ($140 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e agitação ($100 \pm 2,5 \text{ r.p.m.}$). O tempo de incubação em cada análise é de 60 minutos e, para evitar respostas fotossintéticas enviesadas por possíveis diferenças geradas pelo posicionamento das réplicas em relação à fonte de luz, os frascos contendo as amostras algais são reposicionados dentro da incubadora de modo que cada frasco ocupe todas as posições com o mesmo período de tempo para cada posição.

Em adição, para o cálculo da respiração no escuro, foram repetidos os mesmos procedimentos descritos acima para a fotossíntese líquida, porém mantendo as amostras algais em frascos âmbar (os chamados frascos escuros) em condições de ausência de iluminação. Nesse caso, os experimentos, realizados em triplicata, foram mantidas inicialmente no escuro ainda dentro dos frascos erlenmeyer por 30 minutos para sessar a fotossíntese e então transferidos para os frascos âmbar escuros para a realização da análise de fato.

Os cálculos dos valores de fotossíntese líquida e respiração no escuro foram realizados de acordo com o proposto por Littler & Arnold (1985) através das fórmulas: $FL = [(F) - (I)] * V / T_i / PS$ e $R = [(I) - (F)] * V / T_i / PS$, onde FL é a fotossíntese líquida; (F), concentração final de oxigênio dissolvido após o período de incubação; (I), concentração inicial de oxigênio dissolvido antes do período de incubação; (V), volume do meio no frasco; (T_i), tempo de incubação; (PS), peso seco da amostra e (R), respiração no escuro.

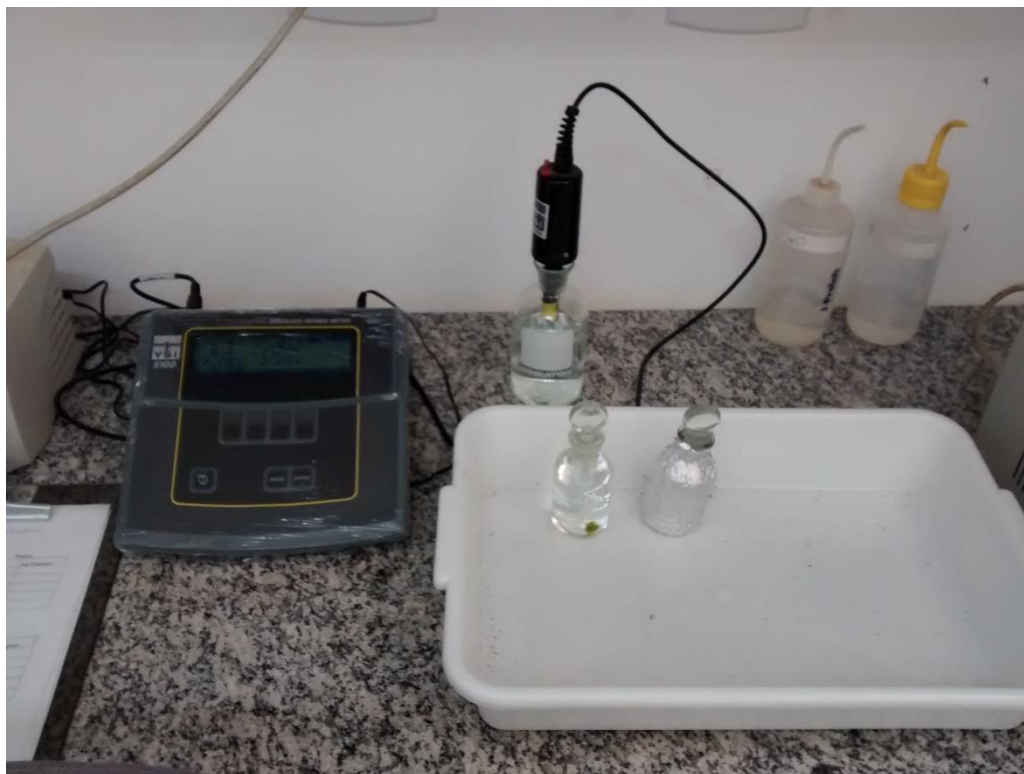


Figura 1. Bancada para a análise dos frascos claros e escuros.

Método da mensuração da concentração da clorofila a

Após a determinação da fotossíntese líquida e dos parâmetros da fluorescência da clorofila, os espécimes foram submetidos às análises de concentração de clorofila *a* corrigida da feofitina por espectrofotometria (Biospectro modelo SP220). As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda 665 e 750 nm, utilizando-se acetona 90% para a calibração (branco da amostra) (Wetzel & Likens, 2000). As concentrações deste pigmento, em $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de peso seco, foram determinadas através das seguintes fórmulas: $[\text{clorofila } a] = (E_b - E_a) \times 26,7 \times V$. Onde (E_b) corresponde a absorbância da amostra antes da acidificação ($A_{665} - A_{750}$); (E_a), absorbância da amostra após a acidificação ($A_{665} - A_{750}$); (V), volume da amostra que corresponde a 10 mL.

Por fim, as amostras de macroalgas foram levadas à estufa de secagem onde ficam por 24 horas à 70°C até que seja obtida uma massa constante. Após esse procedimento, as amostras são pesadas em balança analítica (Shimadzu, AUW220D) para a determinação da massa seca.



Figura 2. Biospectro modelo SP220.

Método da avaliação de parâmetros fotossintéticos utilizando a análise da fluorescência da clorofila a

As medidas de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas utilizando o fluorômetro subaquático Diving-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Após o período de aclimação no escuro (30 minutos – Lichtenthaler *et al.*, 1981; Yannicari *et al.*, 2012), Nos dias T1 e T7, cinco réplicas de cada tratamento foram mantidas em tubos falcon adaptados para o posicionamento da fibra óptica (Figuras 1 e 2), contendo meio de cultura suficiente para encobrir o talo da macroalga. A fibra óptica foi posicionada a aproximadamente 10 mm da amostra de forma que a fluorescência inicial aclimatada ao escuro (F_0) alcançasse um valor entre 300–500 unidades, dentro das mesmas configurações do “measure light” para todas as amostras (measure light intensity = 3; gain = 4; damp = 2). A Curva de Indução (Schreiber *et al.*, 1995) é iniciada acionando a opção “Inductive Curve”.

A Curva de Indução foi realizada utilizando-se luz actínica com intensidade de $285 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, e pulsos de saturação a cada 15 segundos, com duração de 0,8 segundos e intensidade de $2000 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Os parâmetros analisados foram:

1) Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (“effective quantum yield”) (Φ_{PSII}), que indica a eficiência fotoquímica (eficiência de captura de energia) dos centros de reação abertos do PSII de uma planta aclimatada a luz. Calculado a partir da fórmula $\Delta F/F_m'$, onde

$\Delta F = F_m' - F_t$, sendo que F_m' é a fluorescência máxima de uma amostra aclimatada à luz e F_t é a fluorescência transitória. (Genty *et al.*, 1989; Necchi, 2005; Schreiber *et al.*, 1995).

2) “Quenching” fotoquímico (“Photochemical quenching”) (qP), usado para indicar a proporção de centro de reação aberto no PSII, calculado pela fórmula $(F_m' - F_t) \cdot (F_m' - F_o')$ (Baker & Rosenqvist, 2004).

3) Dissipação de calor no complexo antena do PSII (“heat dissipation in the antenna”) (D), que está relacionado ao ciclo das xantofilas, e portanto, à dissipação do excesso de energia na forma de calor para evitar danos ao PSII, calculado pela fórmula $1 - (F_v' \cdot F_m'^{-1})$, onde F_v' corresponde à diferença entre a máxima fluorescência (F_m') e a mínima (F_o') fluorescência da planta adaptada ao claro (Demmig-Adams *et al.*, 1996).

4) Dissipação de calor pelo centro de reação do PSII (“heat dissipation in reaction centers”) (E), corresponde ao excesso de energia dissipada na forma de calor de forma não controlada e que potencialmente pode causar danos oxidativos ao PSII, calculado como $(1 - qP) \cdot (F_v' \cdot F_m'^{-1})$ (Demmig-Adams *et al.*, 1996).

Os valores desses parâmetros foram tomados (Φ_{PSII} e qP) ou calculados (D e E) a partir do último pulso gerados na Curva de Indução, no qual a curva se apresenta maior estabilidade (Murchie & Lawson, 2013).

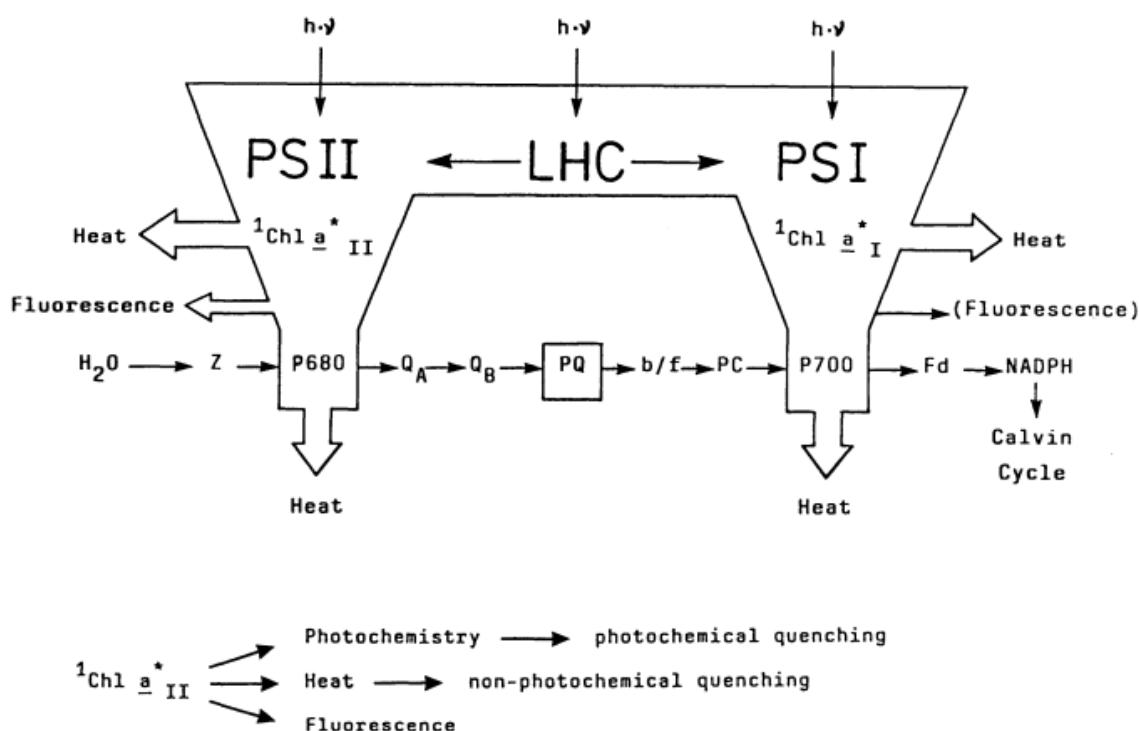


Figura 3. Ilustração da energia absorvida nos fotossistemas e utilizada nas etapas fotoquímicas da fotossíntese e dissipadas na forma de calor e fluorescência. Retirado de Schreiber, 1995.

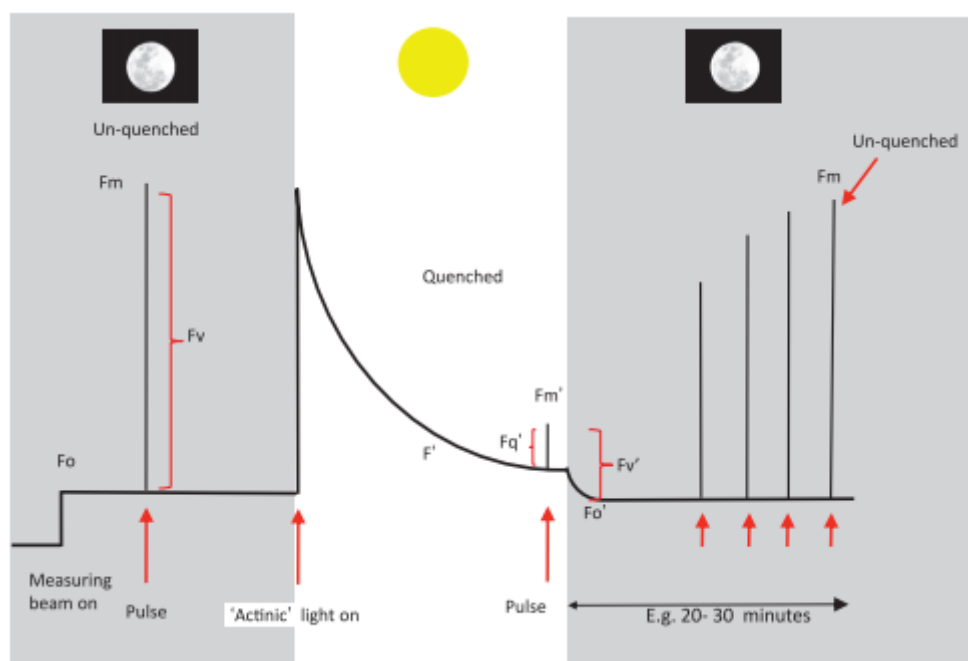


Figura 4. Representação de uma típica cinética de fluorescência da clorofila *a*. Retirado de Murchie & Lawson, 2013.



Figura 5. Bancada para a realização da análise de fluorescência da clorofila *a*



Figura 6. Tubos falcon adaptados para a análise de fluorescência de clorofila *a*

Referências Bibliográficas

Baker, N.R. & Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of experimental botany*, 55(403): 1607-1621.

Christoffoleti, P.J. & López-Ovejero, R.F. 2008. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no Mundo. In: Pedro Jacob Christoffoleti. (Org.). *Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas*. 3 ed. Piracicaba: HRAC-BR, 3-26.

Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., Barker, D.H., Logan, B.A., Bowling, D.R. & Verhoeven, A.S. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 98(2): 253-264.

Genty, B., Briantais, J.M. & Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990(1): 87-92.

Grossmann, K. 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest management science*, 66(2): 113-120.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Döll, M., Fietz, H. J., Bach, T., Kozel, U., Meier, D. & Rahmsdorf, U. 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis research*, 2(2): 115-141.

Littler, M.M. & Arnold, K.E. 1985. Electrodes and chemicals. In: *Handbook of phycological methods. Ecological field methods: Macroalgae*, Little, M.M. & Little, D.S. (Eds.), pp. 349-375. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Murchie, E. H. & Lawson, T. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of experimental botany*, 64(13): 3983-3998.

Necchi, O.Jr. 2005. Light-related photosynthetic characteristics of freshwater rhodophytes. *Aquatic Botany* 82: 193-209.

Necchi, O.Jr. & Zucchi, M.R. 2001. Photosynthetic performance of freshwater Rhodophyta in response to temperature, irradiance, pH and diurnal rhythm. *Phycological Research*, 49: 305-318.

Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C. 1995. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D. & Caldwell, M.M. (eds.): *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin. 49-70.

Thomas, M.L.H. 1988. Photosynthesis and respiration of aquatic macroflora using the light and dark bottle oxygen method and dissolved oxygen analyser. In: *Experimental phycology: A laboratory manual*, C.S. Lobban, D.J. Chapman & B.P. Kremer (Eds.), pp. 64-77. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Vieira, J.J.R. & Necchi, O.JR. 2003. Photosynthetic characteristic of charophytes from tropical ecosystems. *Phycological Research* 51: 51-60.

Wetzel, R.G. & Likens, G.E. 2000. *Limnological Analyses*, 3rded. Springer. New York.

Yannicari, M., Tambussi, E., Istilart, C. & Castro, A.M. 2012. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 210-217.